АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

MICROBIOLOGY

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XIV. ВЫП. 6

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1945

МИКРОБИОЛОГИЯ

Ответственный редактор чл.-корр. Академии Наук СССР Б. Л. Исаченко

Зам. ответственного редактора А. А. Имшенецкий

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

А. Ф. Войткевич, Я. И. Раутенштейн,

В. Л. Рыжков, В. О. Таусон, Ф. М. Чистяков,

В. Н. Шапошников

MICROBIOLOGY

EDITORIAL BOARD:

A. F. Woitkewich, A. A. Imšenecki,

B. L. Issatchenko (Editor), J. I. Rautenstein,

V. L. Rischkow, W. O. Tausson, F. M. Tchistiakov,

W. N. Schaposchnikov

Адрес редакции: Москва, 71, Б. Калужская, 33,
Институт микробиологии Академии Наук СССР

А22434. Подписано к печати 10.XII.1945. Объем 4 печ. л.
6 уч.-изд. л. Тираж 2500 экз. Цена 8 руб. Заказ 837

2-я типография Издательства Академии Наук СССР, Москва, Шубинский пер., 10

Посвящается Б. Л. Исаченко в связи с 50-летием его научной деятельности

К ХАРАКТЕРИСТИКЕ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Л. И. Рубенчик

Способность образовывать сероводород из сульфатов была отмечена у ряда мезофильных [1, 3, 4, 5, 9, 24] и термофильных [21] бактерий и дрожжей [30]. Однако данная функция выражена у них слабо. Наряду с этим, имеется специализированная группа бактерий, проявляющих высокую активность в отношении редукции сульфатов, образующих при благоприятных экологических условиях значительные количества сероводорода и длительно сохраняющих свою жизнеспособность в атмосфере этого ядовитого газа.

Первого представителя этой группы обнаружил Beijerinck [20], который назвал его сперва Spirillum, а позднее Microspira desulfuricans. Van-Delden [22] выделил форму, отличающуюся от бактерии Бейеринка своей галофилией, и назвал ее Microspira aestuarii. Далее Elion [23] описал под именем Vibrio thermodesulfuricans термофильную форму. Нами [12] была обнаружена бактерия, которая, в отличие от Microspira desulfuricans и Microspira aestuarii, использует в качестве источника энергии и углерода уксусную и масляную кислоты. Baars [19] подтвердил наши данные и рассматривает эту бактерию как самостоятельный вид, для которого он предложил название Vibrio Rubentschikii.

Вместе с тем, он пришел к заключению, что бактерии Бейеринка, ван-Дельдена и Элиона представляют не самостоятельные виды, а лишь адаптированные к условиям температуры или солености среды формы одного и того же вида Vibrio desulfuricans. Starkey [28] впервые обнаружил у этого вида спорообразование и поэтому отнес его к новому роду Sporovibrio.

В настоящей статье приведены некоторые новые данные к характеристике этих бактерий.

Выделение чистых культур

Получение сульфатредуцирующих бактерий в чистой культуре сопряжено с известными трудностями, которые объясняются следующими причинами:

1) применяемые питательные среды обладают незначительными элективными свойствами;

2) сульфатредуцирующие бактерии легко вступают во взаимоотношения с различными бактериями, и их нелегко отделить от сопутствующих видов;

3) вследствие многообразия морфологических форм у этих бактерий чистую культуру можно при бактериоскопическом анализе принять за нечистую.

Прямое выделение чистой культуры не удается. Поэтому приходится сначала получить обогащенную культуру. Для накопления Sporovibrio desulfuricans лучше всего брать соли молочной кислоты как единственный источник углерода. Хлористый аммоний как источник азота следует предпочесть аспарагину, так как при наличии последнего наблюдается

более обильное развитие спутников. На дестиллированной воде сульфатредуцирующие бактерии, в соответствии с указанием Beijerinck [20], развиваются хуже, чем на водопроводной. Закисное железо, которое вносится в среду как индикатор на сероводород, окисляясь, переходит в окисное железо. Чтобы избежать этого, ван-Дельден рекомендовал прибавлять к среде Na_2S. Элион стерилизовал концентрированный раствор $FeSO_4$ отдельно от остальной среды; однако и при этом способе образуется осадок окисного железа [25]. Таусон [17], в опытах которого образование окисного железа угнетало развитие сульфатредуцирующих бактерий, разделял среду на две части. Из пробирки, в которой находился раствор сернокислого железа, перед стерилизацией выкачивался воздух. Очищение этой соли проводилось осаждением ее концентрированного раствора 96% спиртом с последующим высушиванием на воздухе до исчезновения запаха спирта. Пельш [10] считает, что окисное железо не оказывает неблагоприятного влияния на бактерии. Значение закисной соли, по его мнению, заключается в освобождении среды от растворенного кислорода, т. е. в создании более строгих анаэробных условий. Наши наблюдения показывают, что и при обеспечении анаэробиоза другими способами предпочтения заслуживают закисные соли. Если выкачивание воздуха по способу Таусона затруднено по техническим причинам, можно, как предложили Gahl и Anderson [25], стерилизовать кристаллик соли Мора фламбированием, а затем вносить его в простерилизованную среду.

Состав питательной среды, с успехом применявшийся нами для накопительной культуры, был следующий:

молочнокислого натрия	3 г
хлористого аммония	1 »
сернокислого магния	2 »
K_2HPO_4	0,5 г
сернокислого марганца	0,2 »
молибденовокислого аммония	следы
соли Мора	»
pH	7,2—7,4

Стерилизацию среды лучше всего производить при помощи ультрафильтрации, как это предложил Пельш [10].

Строго анаэробные условия безусловно необходимы для успешного выделения чистой культуры. Ван-Дельден вносил в жидкую среду Na_2S, а Baars H_2S (1 см³ 0,1 *N* на 60 см³ среды). Однако Starkey [28] нашел, что прибавление сероводорода задерживает развитие сульфатредуцирующих бактерий. Полного внимания заслуживает культивирование последних в атмосфере водорода по методу Пельша [10] — в склянках с двумя тубулусами. Через нижний тубулус производится набирание среды для исследования, а через верхний, соединенный с аппаратом Киппа, поступает водород. При массовых посевах можно пользоваться методом Исаченко [6], но перед посевом прокипятить среду, а затем быстро ее охладить.

Накопление Vibrio Rubentschikii производится так же, как и вышеуказанного вида, но с заменой молочнокислого натрия уксуснокислым натрием.

Если посевной материал, например, соленоозерная вода или вода минеральных источников, беден сульфатредуцирующими бактериями, то ингредиенты вышеуказанных сред вносятся в нестерилизованную исследуемую воду. Кузнецов [8] фильтровал воду через мембранный фильтр так, чтобы из 100 см³ воды на фильтре оставалось лишь 3—5 см³, и эту воду засевал в питательную среду. Он же предложил и другой вариант, по которому вода полностью отфильтровывается, а затем в питательную среду вносится фильтр.

Когда накопленная культура получена, необходимо прежде всего установить, образует ли данный штамм споры. При наличии спорообразования (см. ниже) выделение чистой культуры сильно облегчается. В этом случае питательную среду, содержащую спороносные клетки, прогревают при 80° в течение 20 мин., а затем проращивают споры на агаризованной среде вышеуказанного состава в узких стеклянных запаянных трубках или в чашках Петри в атмосфере водорода [28]. Если споры не образуются, то делаются высевы из непастеризованной накопительной культуры. Выросшие в трубках или чашках колонии, окруженные зоной почерневшего агара, приходится очищать последовательными пересевами на твердую среду в анаэробных условиях. Чистоту культуры проверяют высевами на МПА и на агаризированную среду с молочнокислым натрием в аэробных условиях, а также бактериоскопией.

Спорообразование

Starkey [28] нашел, что Sporovibrio desulfuricans образует два морфологически различных типа клеток. Один тип, мезофильный, наблюдается при культивировании бактерий при температуре около 30°. В этих условиях клетки имеют вид типичных мелких вибрионов. Другой тип, термофильный, получается при выращивании при температурах выше 45° и характеризуется формой длинных палочек и длинных вибрионов. Споры образуются только в клетках термофильного типа, т. е. при температурах выше 45°. При спорообразовании клетки набухают и иногда становятся веретеноподобными. Спора субтерминальная $2{,}0 \times 1{,}0$—$1{,}5\,\mu$. Окрасить ее можно по методу Дорнера (кипячение в течение 30 сек. в 5% хромовой кислоте, а затем обработка карболовым фуксином при кипячении в течение 10 мин.). При окраске можно обнаружить клетки, у которых возле одного конца находится очень маленькое, густо окрашенное тельце. Ctarkey полагает, что это ранняя стадия в спорообразовании. Споры выдерживают кипячение — 30 мин., при 90° — 40 мин. и при 80° — 70 мин.

В нашем распоряжении были 12 штаммов вышеуказанной бактерии, выделенные нами из ила сточных вод, и 9 штаммов, выделенных из различных почв. Для обнаружения спор накопленная при 27—30° культура сначала выращивалась при 38—41° и, после нескольких пересевов при этой температуре, переносилась в температуру 50—53°, при которой также производилось несколько пересевов. Затем часть культуры в запаянных ампулках прогревалась при 80° 20 мин. и этот материал переносился в твердую и жидкую питательную среду, которая ставилась при 27—30°. В результате у 3 из 12 штаммов, выделенных из ила, и у 2 из 9 почвенных штаммов наблюдались рост и образование сероводорода, и культуры состояли лишь из мелких вибрионов. При последующем культивировании сначала при 38—41°, а затем при 50—53° появлялись споры и клетки термофильного типа в соответствии с указанием Starkey. Таким образом, данные этого исследователя об образовании спор у Sporovibrio desulfuricans подтвердились. Вместе с тем выявилось, что далеко не все штаммы этой бактерии способны к спорообразованию в указанных выше условиях.

Starkey считает, что высокие температуры необходимы для образования спор у Sporovibrio desulfuricans лишь в условиях лаборатории. В природе же этот вид может продуцировать споры и при умеренных температурах. По его наблюдениям, в сточных водах и иле канав и эстуарий Голландии содержатся споры данной бактерии. В наших опытах при прогреве (80° — 20 мин.) ила и почв в питательной среде или в воде с последующим высевом в питательную среду развитие сульфатредуцирующих бактерий не имело места. Взятый нами материал, следовательно, не содержал жизнеспособных спор.

Наше исследование, проведенное по описанной выше методике, показало, что и Vibrio Rubentschikii образует споры. Их величина 1,4—1,5 × ×1,0—1,2 μ. Окрашиваются по Дорнеру и не окрашиваются способами, применяемыми для окраски вегетативных клеток. Выявляют меньшую теплоустойчивость, чем споры Sprovibrio desulfuricans, выдерживая температуры 80° — 50 мин., 90° — 30 мин. и кипячение 10 мин. Расположение споры в клетке субтерминальное. Спорообразование наблюдается при высоких температурах (50—53°). Из 20 штаммов, выделенных из донных отложений одесских лиманов, споры были обнаружены лишь у 4 штаммов.

Отношение к NaCl

Van-Delden [22] считал, что отношение сульфатредуцирующих бактерий к NaCl принадлежит к устойчивым особенностям этих бактерий, и поэтому различал два их вида — Microspira desulfuricans и Microspira aestuarii. Первая, пресноводная бактерия, развивается при наличии от 0% до 2,5% NaCl. Другая же, морская бактерия, не растет без прибавления этой соли. Оптимум для нее 1,5—3%, максимум выше 10% NaCl [22].

Последующие наблюдения и опыты показали, что у сульфатредуцирующих бактерий, в противоположность мнению ван-Дельдена, отношение к соли вариирует. Rank [27] выделил из морского песка Неаполитанского залива и из пресной воды штаммы, одинаково развивавшиеся как при 3% NaCl, так и без этой соли. Gahl и Anderson [25] нашли, что в одних и тех же пластовых нефтяных водах встречаются совместно штаммы, не одинаково относящиеся к различным концентрациям NaCl. Поэтому эти авторы полагают, что выявленные ими штаммы представляют варианты одного вида. В опытах Baars Vibrio desulfuricans из пресноводного ила сначала образовывал при 3% NaCl мало сероводорода (84 мг на 1 л). После же нескольких пересевов в среду с постепенно возраставшей концентрацией соли эта бактерия образовала при 3% NaCl 410 мг на 1 л. Baars также показал, что типичная форма Vibrio aestuarii после ряда пересевов в среду с понижающимися количествами NaCl стала проявлять высокую активность и в отсутствие этой соли. Исходя из этих данных, Baars считает, что указанные бактерии являются адаптивными формами одного и того же вида.

Следует также отметить, что между содержанием NaCl в определенном биотопе и количествами этой соли, оптимальным и максимальным для жизнедеятельности сульфатредуцирующих бактерий из данного биотопа, существует определенная зависимость: штаммы, живущие в природных условиях при высоких концентрациях NaCl, имеют более высокий солевой оптимум и максимум, чем штаммы из биотопов с малой соленостью. В нефтяных водах Кала (Апшерон) с соленостью 17° Бомэ сульфатредуцирующие бактерии имели оптимум при 7% NaCl, а у штаммов из воды буровых скважин того же нефтерождения, но с соленостью 2° Б, оптимум был при 3% NaCl (Гинзбург-Карагичева [2]). Gahl и Anderson [25] нашли, что штаммы из нефтяной воды Калифорнии, содержавшей лишь 0,1% NaCl, не развивались при 1% этой соли. Штаммы же из более соленой воды других буровых скважин проявляли нормальную жизнедеятельность при концентрациях до 5% NaCl. По степени солености воды лиманы одесской группы могут быть расположены в следующий ряд: Куяльницкий > Хаджибейского > Сухого. Соответственно этому солевой оптимум у сульфатредуцирующих бактерий этих лиманов был такой (Рубенчик):

Штаммы из Куяльницкого лимана . .	5—8% NaCl
» » Хаджибейского » . .	2,5—3,5% »
» » Сухого » . .	1,5—2% »

После резкого и долговременного опреснения Куяльницкого лимана солевой оптимум у сульфатредуцирующих бактерий этого лимана снизился до 2—4% NaCl. Бактерии остались галофильными, но степень их галофилии уменьшилась [13]. Оптимум NaCl для штаммов из Баренцова моря равнялся 2% [6], из Славянских озер — 5% [14], из соленых озер Танатар 8% [7]. Солевой максимум у различных штаммов приведен в табл. 1.

Таблица 1

Солевой максимум у различных штаммов сульфатредуцирующих бактерий

Биотопы	NaCl, %	Авторы
Салины на Яве	30	Hof [26]
Тамбуканское озеро	20—30	Свешникова [16]
Куяльницкий лиман	20	Хаит [17а], Рубенчик [12]
Нефтяные воды Апшерона	18	Гинзбург-Карагичева [2]
Хаджибейский лиман	15	Рубенчик [12]
Сухой лиман	12	Рубенчик [12]
Эстуарии Голландии	>10	Van-Delden [22]
Городские канавы Дельфта	2,5	Van-Delden [22]
Нефтяные воды Калифорнии	1—5	Gahl и Anderson [25]

Нами были проведены опыты с шестью штаммами Sporovibrio desulfuricans, выделенными из ила сточных вод. Опыты были поставлены тотчас же после получения этих штаммов в чистых культурах. Их первоначальное отношение к NaCl указано в табл. 2.

Таблица 2

Влияние различных концентраций NaCl на образование сероводорода в культурах Sporovibrio desulfuricans

Штаммы	Количество образованного за 10 сут. H_2S в мг на 1 л					
	0%	1%	2%	3%	4%	5%
К-1	136,5	113,3	90,1	66,3	26,6	0
К-2	208,0	195,4	66,3	31,0	0	0
К-3	324,1	318,6	198,0	74,0	18,1	0
К-4	127,5	104,5	69,4	21,0	0	0
К-7	104,3	100,0	71,0	34,0	0	0
К-9	147,1	133,1	106,7	73,0	24,0	0

Как видно из этой таблицы, максимальными концентрациями NaCl, при которых еще наблюдалось за 10 сут. образование сероводорода, оказались для различных штаммов 3—4%.

Один из способов адаптации этих штаммов заключался в том, что из культуры, выросшей при 0% NaCl, делался пересев в среду с 1% соли, оттуда в среду с 2% соли и т. д., при повышении с каждым посевом концентрации соли на 1%.

Полученные результаты приведены в табл. 3.

Данные в табл. 3 показывают, что в результате адаптации солевой максимум [1] у различных штаммов повысился с 3—4% до 6—8% NaCl. Кроме того, количества образованного сероводорода были больше при постепенном (табл. 3), чем при резком (табл. 2) повышении концентрации.

В другом варианте опыта была осуществлена более длительная адаптация в условиях максимальной для данного штамма концентрации NaCl.

[1] В данном случае под солевым максимумом условно понимается та максимальная концентрация NaCl, при которой еще имело место образование сероводорода в 10-суточной культуре. Возможно, что в более старых культурах солевой максимум был бы выше.

Таблица 3

Влияние постепенного повышения концентрации NaCl на образование сероводорода в культурах Sporovibrio desulfuricans

Концентрации NaCl (%), в которых сделаны пересевы	Количество образованного за 10 сут. H_2S, мг/л					
	К-1	К-2	К-3	К-4	К-7	К-9
0 в 0	123,1	214,7	301,0	108,1	118,3	124,0
0 » 1	119,6	199,9	317,4	104,1	101,7	119,7
1 » 2	98,3	94,0	243,3	74,0	94,0	104,9
2 » 3	95,7	78,0	131,2	67,3	59,0	97,1
3 » 4	68,1	57,2	67,3	31,0	41,9	83,0
4 » 5	57,6	39,1	41,1	27,0	33,0	46,0
5 » 6	39,1	21,3	18,1	12,3	19,1	24,5
6 » 7	27,8	19,7	0	0	0	0
7 » 8	24,0	19,4				
8 » 9	0	0				

Для этого из культуры, выросшей, например, при концентрации 6% соли, делались последовательные пересевы в среду с такой же концентрацией соли. В результате (табл. 4) количество образованного H_2S постепенно возрастало.

Таблица 4

Влияние адаптации при максимальных концентрациях NaCl на образование сероводорода в культурах Sporovibrio desulfuricans

Концентрации NaCl (в %), в которых сделаны пересевы	Количество образованного за 10 сут. H_2S, мг/л			
	К-1	К-2	К-3	К-9
6 в 6/I			27,3	48,5
6/I » 6/II			47,4	57,3
6/II » 6/III			69,1	69,4
8 » 8/I	29,1	27,5		
8/I » 8/II	38,3	34,5		
8/II » 8/III	44,1	70,1		

Особенно интересный результат был получен при культивировании штамма К-1 в среде с 3% соли (табл. 5). После 4 последовательных пересевов этот штамм образовал при 3% NaCl гораздо больше сероводорода (209,7 мг/л), чем при 0% NaCl (84,7 мг/л). Таким образом, он превратился, в условиях эксперимента, в галофила, т. е. приобрел свойство, характерное для Microspira aestuarii.

Таблица 5

Влияние адаптации при 3% NaCl на образование сероводорода в культурах Sporovibrio desulfuricans

Концентрации NaCl (в %), в которых сделаны пересевы	Количество образованного за 10 сут. H_2S, мг/л		
	К-1	К-2	К-4
3 в 3/I	104,8	85,4	71,4
3/I » 3/II/	150,0	97,1	83,1
3/II/ » 3/III/	191,3	146,3	85,6
3/III/ » 3/IV/	209,7	151,0	86,7
3/IV/ » 0	84,7	201,1	101,1

На основании приведенных выше данных можно считать доказанным, что бактерии, описанные Бейеринком и ван-Дельденом как само-

стоятельные виды, являются в действительности адаптивными формами одного вида Sporovibrio desulfuricans (Beijerinck) Starkey.

Отношение к некоторым органическим соединениям

Как уже было выше указано, Vibrio Rubentschikii может использовать некоторые органические соединения, которые Sporovibrio desulfuricans не усваивает.

Наряду с другими, к таким соединениям принадлежат пропионаты, бутираты и ацетаты. Baars выделил форму, которая усваивала пропионаты и бутираты, но не ацетаты, и назвал ее Vibrio Rubentschikii var. anomalus. Stephenson и Stickland [29] нашли бактерию, которая по своему биохимизму должна быть отнесена к Vibrio Rubentschikii, но которая в отношении углеродистого питания оказалась более специализированной, чем типичные формы Vibrio Rubentschikii и Sporovibrio desulfuricans. Штурм [18], а также Салимовская-Родина и Нечаева [15] обнаружили разновидности Vibrio Rubentschikii, которые, в отличие от типичной формы, не усваивали мальтозы и пальмитиновой кислоты [18], олеиновой и муравьиной кислот [15].

Мы поставили перед собой задачу добиться того, чтобы Sporovibrio desulfuricans усваивал уксуснокислый натрий или маслянокислый натрий. Опыты были проведены с 4 штаммами (К-1, К-3, К-5, К-6), выделенными из ила сточных вод, и 2 штаммами из садовой почвы (Л-1, Л-4) и заключались в следующем:

1. Бактерии были внесены в среду с 0,1% молочнокислого натрия (А), в ту же среду с добавлением 0,1% уксуснокислого натрия (Б) и в среду (А) с добавлением 0,1% маслянокислого натрия (В).

Как видно из табл. 6, количества сероводорода, образованные на этих трех средах, были, примерно, одинаковыми и, следовательно, добавленные соединения не были использованы.

Таблица 6

Количество образованного за 60 сут. H_2S, в мг/л

Среды	Штаммы					
	К-1	К-3	К-5	К-6	Л-1	Л-5
А	125,0	127,1	217,7	144,0	127,0	134,1
Б	111,0	134,4	224,3	156,1	105,0	130,2
В	129,4	116,5	205,7	141,5	114,3	118,7

2. Бактерии, развившиеся в среде с 100 мг молочнокислого натрия на 100 см³, были пересеяны в среду с 60 мг молочнокислого натрия и 40 мг уксуснокислого натрия или 40 мг маслянокислого натрия на 100 см³; оттуда был сделан пересев 20-суточных культур в среду с 40 мг лактата и 40 мг ацетата или бутирата. Последующие пересевы были произведены в среды с постепенно уменьшающимися концентрациями лактата до полного его исключения. Результаты показали, что ни один штамм не начал использовать указанные соединения.

3. Baars нашел, что только свежевыделенные штаммы сульфатредуцирующих бактерий легко приспособляются к экологическим условиям. После же длительного пребывания в лаборатории они становятся малопригодными объектами для опытов по изменчивости. В связи с этим, мы провели серию опытов не с чистыми культурами Sporovibrio desulfuricans, а с образцами ила и почвы, содержащими эту бактерию. Однако посевы этих образцов в среду с маслянокислым или уксуснокислым натрием не привели к развитию Sporovibrio desulfuricans. Мы не добились

желаемого результата и тогда, когда образцы ила и почвы вносились в среды, содержащие лактат + ацетат (или бутират), а затем концентрации лактата уменьшались.

Таким образом, нам не удалось добиться того, чтобы указанный вид мог использовать как источник углерода и энергии уксуснокислый или маслянокислый натрий.

Обсуждение полученных данных

Отличие Sporovibrio desulfuricans от Vibrio Rubentschikii не ограничивается тем, что последний может использовать более широкий ассортимент органических веществ, но касается и биохимизма этих бактерий. Vibrio Rubentschikii осуществляет более полные окислительные реакции, чем Sporovibrio desulfuricans. Так, в культуре первой бактерии молочнокислый натрий окисляется до CO_2, тогда как в культуре второй бактерии окисление прекращается на стадии образования уксусной кислоты [19]:

$$2\,C_3H_5O_3Na + 3\,MgSO_4 = 3\,MgCO_3 + Na_2CO_3 + 2\,CO_2 + 3\,H_2S + 2\,H_2O$$
(Vibrio Rubentschikii)

$$2\,C_3H_5O_3Na + MgSO_4 = 2\,C_2H_3O_2Na + MgCO_3 + CO_2 + H_2S + H_2O$$
(Sporovibrio desulfuricans)

Уксусная кислота образуется и у Vibrio Rubentschikii, но только как промежуточный продукт [19]. Дальнейшее ее окисление до CO_2 представляет трудно осуществимую, с термодинамической точки зрения, реакцию, так как она сопровождается повышением уровня свободной энергии (Пельш, [11]):

$$2\,CH_3COOH + 4\,H_2O \rightarrow 8\,H_2 + 4\,CO_2$$
$$\Delta F_{298}^{\circ} = +\,36\,622 \text{ кал}$$

Что же касается Sporovibrio desulfuricans, то он может осуществлять лишь такие реакции, которые проходят со снижением уровня свободной энергии и, следовательно, имеют предпосылки к спонтанному протеканию [11].

Учитывая эти особенности, а также принимая во внимание, что нам не удалось добиться усвоения ацетата и бутирата натрия Sporovibrio desulfuricans, можно согласиться с Baars, что эта бактерия и Vibrio Rubentschikii представляют собой два самостоятельных вида. Поскольку, как мы нашли, и Vibrio Rubentschikii образует споры, его необходимо также отнести к роду Sporovibrio.

В 5-м издании определителя Bergey (1939) спириллы и вибрионы отнесены к семейству Pseudomonadaceae. К двум уже имеющимся в этом семействе трибам Spirilleae и Pseudomonadeae следует прибавить третий — Sporovibrioneae [28] с единственным родом Sporovibrio, заключающим два вида — Sporovibrio desulfuricans и Sporovibrio Rubentschikii.

Выводы

1. Sporovibrio desulfuricans и Sporovibrio Rubentschikii при культивировании их при высоких температурах могут образовать споры.

Спорообразование наблюдается лишь у некоторых штаммов этих бактерий.

2. Путем адаптации к NaCl может быть повышен солевой максимум у Sporovibrio desulfuricans.

В условиях эксперимента негалофильный штамм этой бактерии превратился в галофильный.

3. Sporovibrio desulfuricans не усваивает ни уксуснокислого, ни масля-

нокислого натрия и не приобретает способности усваивать эти соединения даже после длительной адаптации.

4. Sporovibrio Rubentschikii можно рассматривать как самостоятельный вид.

Институт микробиологии
Академии Наук Украинской ССР
Киев

Получено 25.IV. 1945.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брусиловский Е. М. К вопросу о роли микроорганизмов в образовании лечебной грязи. Отчеты о деятельности Одесск. бальн. общ., вып. 4, 1892.
2. Гинзбург-Карагичева Т. Л. Очерки микробиологии нефти, ОНТИ НКТП СССР, 1936.
3. Горовиц-Власова Л. М., Ровенская Э. М. и Зонтаг А. Д. Экспериментальные исследования по рыбоконсервному делу. Тр. Цент. н.-и. ин-та биохим. и пищев. пром., вып. 4—12, стр. 143, 1932.
4. Зелинский Н. Д. О сероводородном брожении в Черном море и Одесских лиманах. Журн. Русск. физ.-хим. общ., часть хим., т. 25, стр. 298, 1893.
5. Зонтаг А. Д. К вопросу о микробиологии рыбных консервов. Тр. Центр. н.-и. ин-та биохим. и пищев. пром., вып. 4—12, стр. 113, 1932.
6. Исаченко Б. Л. Исследование над бактериями Северного Ледовитого океана. Петроград, 1914.
7. Исаченко Б. Л. Хлористые, сульфатные и содовые озера Кулундинской степи и биогенные процессы в них. Тр. Совета по изуч. произв. ресурсов, вып. 8, 1934.
8. Кузнецов С. И. Сравнительная характеристика микрофлоры мацестинских и агурских источников. Микробиология, т. VII, вып. 3, 1938.
9. Малиянц А. А. Микроорганизмы—образователи лечебных грязей и сероводородного брожения. Изв. Азербайдж. гос. унив., т. 5, стр. 5, 1926.
10. Пельш А. Д. О восстановлении сульфатов в воде Каспийского моря. Тр. Соляной лаб., вып. 5, стр. 81, 1936.
11. Пельш А. Д. К энергетике десульфатационного процесса. Тр. Соляной лаб., вып. 14, стр. 45, 1937.
12. Рубенчик Л. И. К вопросу об источниках энергии для процесса десульфуризации в лиманах. Укр. бальн. сб., вып. 2—3, стр. 82, 1927.
13. Рубенчик Л. И. и Гойхерман Д. Г. Влияние опреснения лиманов на микрофлору лечебных грязей. Арх. биол. наук, т. 43, вып. 2—3, стр. 218, 1936.
14. Рубенчик Л. И. и Гойхерман Д. Г. К микробиологии биоанизотропных соленых водоемов. Микробиология, т. VIII, вып. 5, стр. 533, 1939.
15. Салимовская-Родина А. Г. и Нечаева Н. Б. Процесс десульфатизации в Старорусской лечебной грязи. Микробиология, т. IX, вып. 7—8, стр. 655, 1940.
16. Свешникова И. А. К вопросу об участии в грязеобразовательном процессе в Тамбуканском озере стально-серой глины. Тр. Бальнеол. ин-та Кавказ. мин. вод, т. 3, стр. 165, 1926.
17. Таусон В. О. Восстановление сульфатов бактериями в присутствии углеводородов. Микробиология, т. 1, вып. 3, стр. 229, 1932.
17а. Хаит С. З. Microspira desulfuricans Куяльницкого лимана, Журн. н.-и. кафедр в Одессе, т. 1, № 10—11, 1924.
18. Штурм Л. Д. К изучению микрофлоры серосодержащих пород. Микробиология, т. VI, вып. 4, стр. 481, 1937.
19. Baars J. B. Over sulfatreductie door bacterien. Delft, 1930.
20. Beijerinck M. W. Über Spirillum desulfuricans als Ursache von Sulfatreduktion. Ctbl. Bakt., Abt. II, Bd. 1, 1895.
21. Clark F. M. and Tanner F. W. Studies on the bacterial metabolism of sulfur. II. Formation of hydrogen sulfide by thermophilic bacteria. Ctbl. Bakt., Abt. II, Bd. 98, p. 298, 1938.
22. Delden A. van. Beitrag zur Kenntnis der Sulfatreduktion durch Bakterien. Ctbl. Bakt., Abt. II, Bd. 11, S. 117, 1904.
23. Elion L. A thermophilic sulphate reducing Bacterium. Ctbl. Bakt., Abt. II, Bd. 63, S. 58, 1924.
24. Emmerich R., Graf zu Leiningen W. and Loew O. Über schädliche Bakterientätigkeit im Boden und über Bodensäuberung. Ctbl. Bakt., Abt. II, Bd. 29, S. 668, 1911.
25. Gahl R. and Anderson B. Sulphate-reducing bacteria in California oil waters. Ctbl. Bakt., Abt. II, Bd. 73, p. 331, 1928.
26. Hof. Investigations concerning bacterial life in strong brines (Diss.). Amsterdam, 1935.
27. Rank A. Beiträge zur Kenntnis der sulfatreduzierenden Bakterien (In Dissert.). Zürich, 1907.

28. Starkey R. L. A study of spore formation and other morphological characteristics of Vibrio desulfuricans, Arch. Mikrob., Bd. 9, S. 268, 1938.
29. Stephonson M. and Stickland L. H. The reduction of sulphate to sulphide by molecular hydrogen. Bioch. J., v. 25, N. 1, p. 215, 1931.
30. Tanner F. W. Studies of the bacterial metabolism of sulfur. II. Formation of hydrogen sulphide from certain sulfur compounds by yeastlike fungi. J. Amer. Chem. Soc., v. 40, p. 663, 1918.

TO THE CHARACTERISTICS OF SULPHATE REDUCING BACTERIA

L. I. Rubentschik

Summary

1. Sporovibrio desulfuricans and Sporovibrio Rubentschikii may produce spores, if cultivated at high temperatures.

Spore-formation is observed only in some strains of these bacteria.

2. By means of adaptation to NaCl the salt maximum of Sporovibrio desulfuricans may be increased.

Under experimental condition a non-halophile strain of this bacterium was transformed into a halophile one.

3. Sporovibrio desulfuricans does not assimilate either sodium oxalate or sodium butyrate and does not acquire the ability to assimilate these compounds even after a prolonged period of adaptation.

4. Sporovibrio Rubentschikii may be considered as an independent species.

Institute of Microbiology
of the Ukrainian Academy of Sciences
Kiev

ЕСТЕСТВЕННЫЕ ВАРИАНТЫ BAC. MYCOIDES И ИХ ДИАГНОСТИКА

Е. Н. Мишустин

Введение

Уже первые исследователи, работавшие с Bac. mycoides, могли отметить, что в природе встречаются весьма различные по типу колоний разновидности этого микроба. Однако до настоящего времени не были достаточно изучены естественные варианты Bac. mycoides и их распространение в различных почвах.

Последние 10—12 лет микробиологи неоднократно для своих работ в качестве объекта использовали Bac. mycoides. Они установили, что под влиянием весьма различных факторов типичная, так называемая, складчатая форма этого микроба может образовать некоторое, но довольно ограниченное количество разновидностей, получивших название гладких и промежуточных форм. Из этих исследований невольно напрашивается вывод, что более или менее тождественная изменчивость под влиянием разнообразных причин объясняется их косвенным, а не прямым действием на наследственную субстанцию микробной клетки.

Работы по экспериментальной изменчивости позволили установить, что получаемые в лабораторной обстановке варианты Bac. mycoides весьма напоминают естественные расы этого микроба.

Экспериментируя с весьма многочисленными штаммами Bac. mycoides из различных почв и применяя весьма разнообразные среды, мы пришли к выводу, что естественные варианты этой бактерии могут быть сгруппированы в некоторое количество типов и что их распространение связано с характером почвы.

Наличие у Bac. mycoides довольно резко различающихся между собой вариантов было отмечено уже давно. Holzmüller [7] описал четыре разновидности Bac. mycoides: α, β, γ и δ, отличающиеся по характеру узора, образуемого тяжами микроба на поверхности питательной среды. Хольцмюллер наблюдал лишь молодые несформировавшиеся колонии, и в настоящее время с трудом можно догадаться, с какими вариантами он имел дело.

Среди вариантов Bac. mycoides, полученных Nyberg [9] при разливках старых культур этой бактерии на обычных питательных средах, были обнаружены формы, дающие колонии, весьма похожие на Bac. vulgatus (гладкие формы). В некоторых случаях изолированные варианты отличались стабильными свойствами, в других же они превращались в исходные или давали новые варианты.

Вопросу о диссоциации у Bac. mycoides была посвящена работа Oesterle и Stahl [10]. Эти исследователи пытались ускорить явление диссоциации, культивируя Bac. mycoides в неблагоприятных условиях, и обнаружили появление форм, напоминающих по типу Bac. effusus, Bac. olfactorius и Bac. nanus и т. д. Некоторые из этих вариантов давали даже пигментированные колонии. Все эти формы без особого труда переходили в исходную.

Знакомство с работой Остерле и Сталя заставляет полагать, что она была проведена недостаточно тщательно, почему возникает невольное сомнение в ряде их выводов.

Весьма основательная работа с культурами Bac. mycoides, выделенными из одной клетки, была выполнена Stapp и Zycha [12]. Эти исследователи из обычной складчатой формы Bac. mycoides, дающей мицелевидные колонии, получили варианты, образующие колонии со слитными выростами, мало напоминающими типичные колонии Bac. mycoides. Появление атипичных форм происходило, однако, лишь при продолжительном культивировании Bac. mycoides на жидких средах.

Данные Lewis [8] вполне подтвердили вывод Штаппа и Зиха о более быстром протекании диссоциации в жидких средах.

При энергичном размножении, чему способствуют частые пересевы, число вариабильных клеток возрастает. Полученные им атипичные формы Люис относит к семи группам.

Между собой отдельные варианты, описанные Люисом, подчас отличаются весьма незначительными признаками в структуре колоний.

Люис указывает, что некоторые типы Bac. mycoides, при известных условиях, могут переходить один в другой.

В 1933 г. Кушнарев описал диссоциацию, происходящую под влиянием низких температур. Он обнаружил появление у Bac. mycoides ряда гладких вариантов, отличающихся по культуральным и биохимическим особенностям. Эти разновидности Кушнарев делит на модификации, быстро теряющие приобретенные свойства при культуре на обычных средах, и сальтации — формы с прочно закрепленной наследственностью.

В 1933 г. появились две работы, посвященные плеоморфизму Bac. mycoides. Одна из них принадлежит Schmidt [13], другая den Dooren de Jong [6].

Работа Шмидта еще лишний раз показала возможность появления при явлении диссоциации у Bac. mycoides гладких вариантов.

Этот же вывод делает Ден-Дорен-де-Йонг. Этот автор указал, между прочим, на наличие в природе штаммов Bac. mycoides, имеющих явно выраженный желтоватый оттенок.

Значительное внимание в разбираемой работе было посвящено вопросу возникновения аспорогенных рас у Bac. mycoides. Подобные формы были описаны и другими исследователями (Кушнарев [2], Бородулина [1], Раутенштейн [5]).

Раутенштейн [5] выделил из почв различных местностей СССР и воды 25 штаммов Bac. mycoides. По своим свойствам эти штаммы могли быть разделены на две резко отличные группы. Представители 1-й (складчатые формы) встречаются во всех исследованных почвах, представители 2-й (гладкие формы) — в почвах южных районов. На более частое нахождение в некоторых южных почвах гладких вариантов Bac. mycoides можно найти указание и в других работах (Бородулина [1]).

В лабораторных условиях из ряда культур Bac. mycoides Раутенштейном были получены новые варианты.

Появление резко измененных по форме колоний штаммов Bac. mycoides Нахимовская [4] обнаружила под влиянием воздействия на складчатые расы этого микроба актиномицетов-антагонистов.

Как отмечает и сама Нахимовская, ее гладкие варианты Bac. mycoides ничего общего не имеют с гладкими формами, которые описал Люис и другие исследователи.

Делая известное обобщение из приведенных работ, можно притти к выводу, что основные разновидност естественных и экспериментальных рас Bac. mycoides могут быть разбиты на следующие типы:

I. Складчатый тип, дающий хорошо известные ажурные колонии с правыми или левыми завитками тяжей.

II. Гладкий тип — имеющий более расплывающиеся и относительно короткие тяжи.

III. Антракоидный тип, крайняя форма гладкого типа с совершенно сплывающимися тяжами. Строение края колонии напоминает Bac. anthracoides.

По внешнему виду некоторые варианты Bac. mycoides мало напоминают типичную форму. Может быть, некоторые бактерии, описанные как самостоятельные виды (Bac. cereus, Bac. fluorescens, Bac. albolactis, Bac. prausnitzii и др.), являются разновидностями Bac. mycoides. К этому мнению склоняются Сориано (Soriano), Гордон (Gordon) и другие исследователи.

Классификация естественных вариантов Bac. mycoides

Дифференцировка типов Bac. mycoides, как мы уже указывали выше, обычно производилась на основании развития данного микроорганизма на МПА. Между тем из существующей литературы известно, что тип колоний Bac. mycoides весьма модифицируется в зависимости от состава твердой питательной среды (Хольцмюллер). Нам удалось также показать, что, например, расы Bac. mycoides, весьма разнящиеся между собой, на МПА I, на картофельном агаре дают почти идентичные, судя по макроструктуре, колонии.

Это показывает, что, подобрав определенный состав питательной среды,

можно выявить особенности строения колоний, остающихся замаскированными при развитии микроба на других средах.

Наш опыт показал, что МПА является далеко не оптимальной средой для дифференцировки типа колоний у Bac. mycoides. После ряда экспериментов мы сочли наиболее удобным пользоваться для дифференцировки типа колоний Bac. mycoides средой, содержащей 0,1% пептона Витте и 0,1% K_2HPO_4. Среда готовилась на водопроводной воде и содержала 1,5% агара. Среды иного состава, как МПА, картофельный агар и т. д., позволили подтвердить особенности структур того или иного типа Bac. mycoides, но эти специфические черты здесь вырисовывались значительно хуже и медленнее по времени, чем на пептонном агаре.

Проведение коллекции наших штаммов Bac. mycoides на указанной выше пептонной среде позволило разбить все разнообразие форм данного микроорганизма на следующие основные группы, между которыми, возможно, имеются и промежуточные:

1. Складчатые формы:
   а) обычные, с неопределенной ориентацией тяжей;
   б) с кольчатой структурой тяжей;
   в) со строго ориентированными тяжами.
2. Переходные формы:
   а) дающие эллиптически изогнутые тяжи;
   б) сочетающие эллиптически изогнутые тяжи с радиально расходящимися.
3. Гладкие формы:
   а) дающие расплывчатые тяжи;
   б) образующие антрокоидоподобные колонии.

Следует отметить, что, давая наименование для основных групп Bac. mycoides, мы пользовались уже ранее предложенными терминами. Деление подгрупп оригинально.

Молодые колонии всех типов Bac. mycoides довольно схожи друг с другом, хотя и различаются по узору, образуемому бактериальными тяжами. С возрастом разница между колониями подчас становится заметной и для невооруженного глаза.

Признаки, характерные для того или иного естественного варианта Bac. mycoides, являются наследственно закрепленными и сохраняются в течение ряда лет при поддерживании культуры на МПА.

Как нами будет показано в отдельной статье, особенности структуры колоний того или иного варианта Bac. mycoides нередко связаны с различиями морфологического и физиологического порядка. Таким образом, по нашему мнению, структура колонии косвенно отражает ряд особенностей культуры, выработавшихся в естественной среде, и не представляет производное феномена, воспроизводимого лишь в искусственной обстановке. Весьма возможно, что бóльшую часть отмеченных особенностей мы еще не умеем вскрывать, и поэтому заключения ряда авторов о физиологической тождественности разных вариантов Bac. mycoides мы считаем преждевременными.

Ниже мы даем краткое описание характерных особенностей строения сформировавшихся колоний разных типов Bac. mycoides на пептонной среде.

Тип 1а. Складчатые формы обычного типа. При визуальном осмотре хорошо заметны строго ограниченные в ширину бактериальные тяжи. Они образуют изреженно сетчатый ажурный узор, делающийся более плотным в центральной части колонии. Это является следствием утолщения как основных, так и вторичных бактериальных тяжей. На среде данного состава этот тип Bac. mycoides не дает строгой ориентации тяжей в смысле их отклонения в ту или иную сторону. Обычно отмечается левая ориентация тяжей (против часовой стрелки), более хорошо заметная

в периферической части колонии. На других средах правое или левое вращения становятся ясно заметными.

Колонии этого типа Bac. mycoides обладают диффузным ростом, что в основном связывается с центробежным направлением бактериальных нитей в периферической части колонии.

При микроскопировании края колонии хорошо видно, что бактериальные тяжи, имея в основе прямолинейное направление, вместе с тем бывают нередко изогнуты, и отдельные нити могут давать петлистые структуры.

В молодом возрасте бактериальный тяж обычно имеет более спокойный ход (рис. 1).

Рис. 1. Периферическая часть колонии складчатой расы Bac. mycoides

Рис. 2. Периферическая часть колонии Bac. mycoides с кольчатой структурой

Отход боковых ответвлений от основного тяжа, как правило, совершается под острым углом, причем в месте разъединения тяжей не образуется каких-либо узорчатых структур.

В периферии колонии бактериальные тяжи имеют мало изогнутых бактериальных нитей. Их становится больше в старой части колонии. Это является, очевидно, результатом интеркалярного роста нитей при ограничении возможностей значительного расширения тяжей из-за прочной связи бактериальных клеток в нити.

Старый бактериальный тяж уплотняется, делается более мощным и кажется как бы сплетенным из изогнутых бактериальных нитей.

При постепенном переходе от периферии к центру в колонии учащаются элементы кольчатой и эллиптической структуры, образуемой тяжами. В основном же доминирует остроугольная система ветвлений, создающих весьма сложное переплетение тяжей, образующих разнообразные геометрические фигуры.

Наиболее характерно для данного типа Bac. mycoides, как и для других, строение бактериальных тяжей в периферической части колонии.

Тип 1б. Складчатые формы с кольчатой структурой тяжей. Тяжи культуры Bac. mycoides образуют колонии, весьма напоминающие по всем признакам вышеописанный тип, но значительная часть как периферических, так и центральных тяжей дают у них кольцеобразно завитые образования, наряду с которым могут появляться и узоры эллиптического типа (рис. 2). Эта особенность, хорошо устанавливаемая при микроско-

пировании края колонии, сказывается в некотором отставании роста колонии на агаре по сравнению с обычными складчатыми формами.

На данной среде имевшиеся в нашем распоряжении штаммы Bac. mycoides давали левое, но не особенно резко выраженное вращение тяжей.

Тип 1в. Складчатые формы со строго ориентированными тяжами. Внешне колония Bac. mycoides данного типа отличается правильностью ориентации тяжей и обычно их сильной закрученностью в левую сторону. Тяжи на краю колонии нередко столь сильно закручиваются, что их концы возвращаются к основной массе колонии.

Любопытно то, что если повышение концентрации агара в среде (до 2,5%) вызывает у других типов Bac. mycoides сильную дезориентацию в направлении тяжей, то у данного типа габитус колонии слабо изменяется. Таким образом, тенденция к левому вращению у данных вариантов Bac. mycoides является прочно закрепленной.

Колония имеет ажурную структуру, но тяжи, ее составляющие, отличаются строгостью ориентации и составлены как бы из прямых черточек, написанных чертежным пером.

Эта строгая ориентировка подтверждается и микроскопической картиной. Нежные периферические тяжи идут здесь прямолинейно, отчленяя от себя под острыми углами отходящие в стороны тяжи и отдельные нити. Элементы извитого порядка встречаются здесь в небольшом количестве.

Обычно от основных периферических тяжей в сторону отходят многочисленные короткие отростки.

Ближе к центру в основных тяжах появляется извилистость, наблюдаемая нередко и в боковых отростках. Эта извилистость, как уже отмечалось выше, связывается нами с интеркалярным ростом бактериальных нитей, составляющих тяж.

Приобретая внутреннюю узорчатую структуру, тяжи вместе с тем, сохраняют строго прямолинейную ориентировку.

Тип 2а. Переходные формы, дающие эллиптически изогнутые тяжи. При рассмотрении сформировавшейся колонии бросается в глаза более уплотненная структура колоний этого типа Bac. mycoides. Колония имеет несколько депрессивный характер роста и заметно отстает в развитии на поверхности агара от колоний складчатых рас Bac. mycoides, имеющих тот же возраст. На среде тяжи дают, как правило, слабый уклон в левую сторону.

Отмеченный выше депрессивный рост колоний разбираемого типа зависит от того, что периферические тяжи в основном не идут диффузно в среду, а дают весьма крупные эллипсовидные завитки (рис. 3). Прямолинейно распространяющиеся на агаре тяжи весьма немногочисленны. Эти овально-округлые тяжи ближе к центру дают весьма плотный петлистый рисунок.

В более молодой части колонии бактериальные тяжи имеют ровную структуру благодаря тому, что нити здесь идут параллельно.

В старой части колонии, как и у других типов Bac. mycoides, тяж приобретает сильную извилистость, но основной рисунок, даваемый им, остается прежним. Вместе с этим тяж делается более плотным и мощным. Причины данного явления, как уже отмечалось, обусловливаются интеркалярным ростом бактериальных нитей, дающих к тому же дополнительное ложное ветвление. Стареющие тяжи у переходных форм Bac. mycoides более диффузны, чем у типичных складчатых.

Тип 2б. Переходные формы, имеющие в колонии сочетание эллиптически изогнутых тяжей с радиально изогнутыми. Данный тип Bac. mycoides как бы сочетает в строении своей колонии элементы, присущие предыдущему и типичной складчатой форме. Основная масса колоний, даже в периферическом слое, весьма богата эллиптическими и округло-извитыми тяжами. Около радиально идущих тяжей нередко формируются узорчатые образования, принимающие характер эллипсовидных

петель (рис. 4). При направлении к центру эта петлистость делается все более и более сложной.

У многих колоний этого типа структура петель нежна и в целом имеет ажурный характер. Этим данный тип Bac. mycoides существенно отличается от предыдущего, у которого тяжи, как правило, имеют грубую структуру.

В центральной части колонии тяжи уплотняются, делаются грубее и постепенно приобретают внутреннюю извитую структуру. Тяжи в колонии имеют обычно тенденцию к левому вращению.

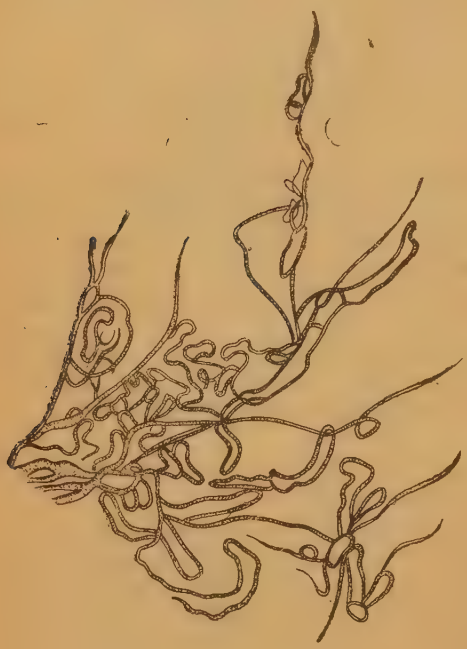

Рис. 3. Периферическая часть колонии Bac. mycoides с эллипсовидной структурой

Рис. 4. Бактериальный тяж колонии Bac. mycoides, дающий эллипсовидные завитки

Тип 3а. Гладкие формы, дающие расплывчатые тяжи. Сформировавшиеся колонии гладких вариантов этого микроба имеют более слизистую консистенцию и широко расплывающиеся бактериальные тяжи. Разрастание идет здесь не столь в радиальном направлении, сколь в ширину тяжей (рис. 5). Это зависит, по указанию ряда исследователей, от более слабого сцепления бактериальных клеток в тяжах. От этого, при наличии вставочного роста, в цепочках часто происходят смещения и образуются все новы и новые параллельные нити. Данное обстоятельство приводит к утолщению колонии за счет известного ограничения и разрастания в ширину.

В силу указанной особенности центр колонии почти сплошь зарастает бактериальной массой, тяжи получаются широкими, а рост колонии более ограниченным. Утолщенные тяжи причудливых очертаний, отходящие от центральной части колонии, имеют обычно левое вращение.

Молодая, еще не сформировавшаяся колония гладкого типа Bac. mycoides на пептонном агаре может быть легко спутана со складчатым типом данного микроорганизма.

Тип 3б. Гладкие формы, образующие антракоидоподобные колонии. Данный вариант Bac. mycoides весьма напоминает предыдущий,

но слияние тяжей здесь происходит еще более полно. Край колонии весьма напоминает Bac. anthracoides с тем лишь отличием, что от основной массы колонии местами в агар отходят причудливой формы извитые тяжи (рис. 6). В краевой части колонии часто хорошо бывает заметна нежно-волосоподобная структура колонии. Иногда колония Bac. mycoides этого типа кажется как бы совершенно прозрачной. Можно бывает уловить ориентацию (обычно левую) тяжей на поверхности агаровой среды.

В молодом возрасте колонии антрокоидного типа Bac. mycoides весьма походят на складчатый вариант этого же микроба.

Рис. 5. Периферическая часть гладкой расы Bac. mycoides

Рис. 6. Край колонны антракоидной расы Bac. mycoides

Говоря об определении типа колоний Bac. mycoides по росту на питательных средах, в том числе и на 0,1% пептонном агаре, необходимо еще раз подчеркнуть, что подобная диагностика становится возможной лишь при изучении динамики развития колоний. Как уже мы отметили выше, в молодом возрасте колонии даже гладких вариантов Bac. mycoides почти тождественны с колониями складчатых типов. Правда, периферические тяжи у первых имеют более извилистую форму, но только исследователь, много работающий с Bac. mycoides, может на молодой колонии правильно произвести определение. Такое же затруднение встречается и при исследовании переходных форм, склонных, правда, и в молодых колониях давать более извитой рисунок.

Лишь после нескольких дней термостатной выдержки ясно обрисовывается облик, свойственный определенному типу Bac. mycoides.

Непригодны для диагностики типа и старые колонии Bac. mycoides. У подобных колоний со временем тяжи даже периферического типа утолщаются, приобретают извилистую структуру и теряют свои характерные очертания. Опытный работник и здесь найдет элементы, характеризующие тип, но они будут в известной степени ретушированными.

Особо должно быть отмечено то обстоятельство, что как на структуру колонии, так и на направление завитков большое влияние оказывает не только состав среды, но и концентрация агара. По нашим наблюдениям, нередко не без влияния оказывается даже температура разливаемого агара. Все эти воздействия не снимают специфических отличий колоний той или иной расы Bac. mycoides, но затрудняют диагностику.

Поэтому при нашей работе мы всегда придерживались строго определенных правил. Агар разливался сильно охлажденным и чашки с питательной средой никогда не подсушивались. Для контроля мы всегда высевали хорошо изученные штаммы определенных типов. Штаммы Bac.

mycoides, тип которых устанавливался, высевались на среду одного и того же состава не менее четырех раз.

При разборе приведенной нами классификации Bac. mycoides может возникнуть вопрос о стабильности характерных особенностей структуры того или иного типа колоний при культуре микроорганизма на других средах.

На этот вопрос может быть дан вполне определенный ответ в том смысле, что отличительные признаки типа колоний сохраняются и на других питательных средах.

Ниже мы приводим краткое описание колоний разных вариантов Bac. mycoides на МПА и картофельном агаре.

Тип 1а на МПА дает хорошо известные типичные колонии. На картофельном агаре образуются более диффузные и ажурные колонии. Изгиб бактериальных тяжей здесь более резко выражен.

Тип 1б образует на МПА типичные по внешнему виду колонии, но элементы кольцевидной структуры вполне вырисовываются при использовании слабых увеличений.

На картофельном агаре эта особенность устанавливается с трудом и то только на определенном возрасте колонии.

Тип 1в на МПА образует колонии, отличающиеся в периферическом слое ажурностью структуры. Основные тяжи у этого типа нежнее, чем у обычного складчатого. Они имеют многочисленные отростки, отходящие под острыми углами.

Указанная особенность может быть отмечена и в колониях, выросших на картофельном агаре. В общем без анализа на пептонном агаре данный тип может быть выявлен лишь с трудом.

Типы 2а и 2б дают на МПА и картофельном агаре весьма схожие колонии.

На МПА колонии внешне совершенно похожи на колонии обычных складчатых рас. Однако в периферическом слое, при рассмотрении под микроскопом, отмечается наличие весьма изогнутых фигурных бактериальных тяжей, имеющих округло-эллипсовидную форму. Обычно данный узор лучше отмечается в части колонии, ближе расположенной к к центру.

На картофельном агаре рассматриваемые варианты Bac. mycoides образуют колонии, почти тождественные колониям складчатых форм данного микроорганизма.

Молодые колонии типа 3а на МПА мало отличаются по своей структуре от колоний складчатых форм. При старении, однако, бактериальные тяжи расплываются, и колония приобретает строение, тождественное описанному при рассмотрении роста гладких вариантов Bac. mycoides на пептонной среде.

На картофельном агаре тип 3а дает рост, почти не отличимый визуально от обычных вариантов Bac. mycoides. Однако при микроскопировании здесь легко обнаруживается специфический узорчатый рисунок тяжей.

Тип 3б отличается от предыдущего лишь большим сплыванием бактериальных тяжей в стареющих колониях на МПА.

На картофельном агаре молодая колония антрокоидоподобной расы Bac. mycoides имеет тяж, весьма богатый разнообразными узорами, характерными для колоний гладких рас данной бактерии. При старении культуры как периферические, так и основные тяжи сильно разрастаются, но не дают сплошного зарастания. На краю колонии широкие тяжи состоят из идущих в разных направлениях ломаных бактериальных нитей. Края их лохматы и имеют многочисленные отростки.

Благодаря отсутствию зарастания пространства между тяжами на картофельном агаре антракоидоподобные колонии приобретают типичный для Bac. mycoides облик.

Этому же способствует диффузное разрастание колоний на картофельном агаре.

Приведенное описание разнообразных штаммов Bac. mycoides на трех средах заставляет нас признать, что отличительные признаки, свойственные определенным расам, остаются постоянными и прочно закрепленными. В то же время на одних средах, как, например, пептонном агаре, эти отличительные черты резко проявляются. На других же средах, как на картофельном агаре, эти отличия значительно стушевываются. Это делает понятным, почему для диагностики типа колоний Bac. mycoides мы остановились на пептонном агаре, содержащем 0,1% пептона.

Выводы

Автором этой работы предложена плотная питательная среда с агаром, на которой различные варианты Bac. mycoides дают значительно более типичный рост, чем на МПА. В состав данной среды входит 0,1% пептона и 0,1% K_2HPO_4.

Все разнообразие естественных вариантов Bac. mycoides, выделенных автором из различных почв Советского Союза, можно разбить на следующие группы:

1. Складчатые формы:

а) обычные, с неопределенной ориентацией бактериальных тяжей в колонии;

б) с кольчатой структурой тяжей;

в) со строго ориентированными тяжами.

2. Переходные формы:

а) дающие эллиптически изогнутые тяжи;

б) сочетающие эллиптически изогнутые тяжи с радиально расходящимися.

3. Гладкие формы:

а) дающие расплывчатые тяжи;

б) образующие антрокоидоподобные колонии.

На других средах (МПА, картофельный агар) колонии каждого типа Bac. mycoides сохраняют характерные для них элементы, но они вырисовываются менее ярко, особенно на картофельном агаре.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР

Получено 2.XII. 1944

ЛИТЕРАТУРА

1. Бородулина Ю. С. Взаимоотношение почвенных актиномицетов и Bac. mycoides. Микробиология, т. IV, в. 4, стр. 561, 1935.
2. Кушнарев М. А. О некоторых закономерностях индивидуальной изменчивости Bac. mycoides, Bac. mesentericus. Микробиология, т. II, стр. 118, 1933.
3. Мишустин Е. Н. и Пушкинская О. И. Распространение Bac. mycoides Flügge в почвах разных типов. Микробиология, т. X, вып. 4, стр. 439, 1941.
4. Нахимовская М. И. Антагонизм между актиномицетами и почвенными бактериями. Микробиология, т. IV, в. 2, стр. 131, 1937.
5. Раутенштейн Я. И. Об изменчивости Bac. mycoides Flügge. Тезисы диссертации, 1937.
6. Den Doren de Jong L. Über Bacillus mycoides und den Pleomorphismus. Arch. f. Microb., Bd. 4, 36, 1933.
7. Holzmüller K. Die Gruppe des Bacillus mycoides Flügge. Ctbl. Bakt., Abt. II, Bd. 23, 304, 1909.
8. Lewis J. Dissociation and life cycles of Bacillus mycoides. J. Bcat., v, 24 381, 1932.
9. Nyberg C. Morphologie der Bac. mycoides. Sociat. Scient. Finnic. Commentat. Biolog., III, N 3, 1927.
10. Oesterlek und Stahl C. Untersuchungen über den Formenwechsel und Entwicklungsformen bei Bacillus mycoides. Ctbl. Bact., Abt. II, Bd. 79, 1, 1930.
11. Perlberger J. Über die fermentative Wirkung der Gruppe des Bac. mycoides und seiner nächsten Verwandten auf Kohlenhydrate usw. Ctbl. Bact., Abt. II, Bd. 62, 1, 1924.

12. Stapp C. und Zycha H. Morphologische Untersuchungen an Bac. mycoides. Ein Beitrag zur Frage des Pleomorphismus der Bakterien. Arch. Microb., Bd. 2, 492, 1931.
13. Smidt H. Über Dimorphie bei Milzbrand-Würzelbacillen und Sarcinen. Z. Hyg. u. Infektionskrank., Bd. 115, 54, 1933.

NATURAL VARIANTS OF BAC. MYCOIDES AND THEIR DIFFERENTIATION

E. N. Mishustin

Summary

The author of the present article recommends an original agar nutrient medium on which the different variants of Bac. mycoides produce a much more typical growth than on meat-peptone agar. This medium contains 0.1 per cent peptone and 0.1 per cent of K_2HPO_4.

All the multifold variety of the natural variants of Bac. mycoides, isolated by the author from different soils of the Soviet Union may be distributed in several groups as follows:

1. Rough forms:

a) colonies of the usual type with an indefinite orientation of bacterial tracts,

b) with an annulated structure of the tracts,

c) with tracts, showing a strictly determined orientation.

2. Intermediate forms:

a) producing elliptically bent tracts,

b) combining elliptically bent tracts with radial ones.

3. Smooth forms:

a) producing diffuse tracts,

b) forming colonies of an anthracoid shape.

On other media (meat peptone agar, potato agar) colonies of each type of Bac. mycoides show the elements characteristic of the type, but they are not so vivid, particularly on potato agar.

Institute of Microbiology
of the Academy of Sciences of the USSR
Moscow

СТИМУЛЯЦИЯ ПОЛОВОГО ПРОЦЕССА У ГРИБОВ ПРОДУКТАМИ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ

Н. А. Красильников

В предыдущих работах (1940—1944) мы отмечали, что многие бактерии стимулируют рост растений. Эти бактерии названы нами активаторами. Действие их обусловлено продуктами жизнедеятельности — ростовыми веществами или фитогормонами.

Продолжая изучать действие почвенных бактерий на отдельные функции организмов, мы подметили, что некоторые из них влияют на половой процесс низших растений.

В настоящей статье мы излагаем результаты специальных исследований по данному вопросу. Нами были обследованы разные виды бактерий, дрожжей и грибов. Тест-объектом служил грибок Phycomyces — плюс и минус-варианты, полученные от профессора Л. И. Курсанова.

Для опытов была подобрана специальная среда. Состав ее таков: дестиллированная вода — 1 000 г, K_2HPO_4 — 0.5 г; $MgCO_3$ — 0,5 г; NaCl — 0,5 г; KNO — 1 г; FeSO — 0,001 г; мел — 1 г; сахароза 20 г; агар-агар — 2%. Стерилизация в автоклаве при 110°С — 40 мин.

На этой среде грибок Phycomyces не образует ни воздушного мицелия, ни спороносцев. Под микроскопом, при малом увеличении, заметны стелящиеся по поверхности агара нити его. Как правило, эти нити при высеве плюс- и минус-вариантов не смыкаются и не сливаются между собой и зигот не образуют. Если к этой среде прибавить небольшое количество дополнительных веществ, то слияние половых нитей и образование зигот происходит в большем или меньшем количестве.

Прибавляя к среде чистые культуры микроорганизмов, мы могли по количеству и времени образования зигот определять наличие у них особых веществ, ускоряющих слияние половых клеток грибка. Методика была такова: по поверхности агара, в пробирках или в чашках Петри высевались раздельно штрихом плюс- и минус-варианты грибка Phycomyces, затем между ними наносилась живая культура испытуемых микроорганизмов. Культура помещалась в термостат при 25°С. Через 6—10 дней определялись результаты.

Нами были испытаны следующие организмы: азотобактер — 9 штаммов (Az. Chroococcum — 5 штаммов, Az. agile — 3 штамма, Az. sp. — 1 штамм); клубеньковых бактерий — 10 штаммов (бактерий клевера — 3 штамма; бактерий люцерны — 2 штамма; бактерий фасоли — 1 штамм; гороха — 2 штамма; вики — 1 штамм; конских бобов — 1 штамм); B. radiobacter — 1 штамм; Ps. tumefaciens — 1 штамм, Ps. fluorescens — 15 штаммов; Achromobacter — 10 штаммов; спороносных бактерий — 10 штаммов (B. mycoides — 3 штамма; B. mesentericus — 2 штамма; B. subtilis — 4 штамма); микрококки — 6 штаммов (Micrococcus albus, M. flavus, M. citreus); микобактерии — 8 штаммов (Mycobacterium album — 3 штамма, M. flavum — 2 штамма, M. citreum — 3 штамма); актиномицеты — 7 штаммов (A. violacens, A. coelicolor, A. albus); дрожжи — 8 штаммов (S. cerevisiae — 3 штамма, S. paradoxus, S. globosus — 2 штамма; Torula rosea); эндомицеты — 3 штамма (Guilliermondella — 2 штамма, Endomyces sp. 1 штамм) и грибы—6 штаммов (Aspergillus niger, A. flavus, Penicillium glaucum).

Все эти организмы выращивались предварительно на питательных средах (бактерии и актиномицеты на МПА, грибы и дрожжи на суслоагаре). Затем они снимались петлей и наносились штрихом между вариантами грибка Phycomyces на указанный выше синтетический агар.

Эти исследования показали, что все штаммы азотобактера, клубеньковых бактерий, спороносных бактерий и грибов не оказывают никакого влияния на половой процесс фикомицета. Из микобактерий только культуры M. citreum способствуют копуляции и зиготообразованию грибка. Из неспороносных бактерий положительный результат дали 7 из культур Pseudomonas и 3 штамма Achromobacter. Из грибков активируют половой процесс две культуры — Torula rosea и Guilliermondella. Сопоставляя между собой активность этих организмов по количеству и времени образования зигот, мы получили следующие результаты (табл. 1).

Таблица 1

Влияние чистых культур микроорганизмов на половой процесс

Микроорганизмы	Рост микробов на среде	Вегет. рост грибка на среде	Образование зигот: время в сутк.	Образование зигот: число	Микроорганизмы	Рост микробов на среде	Вегет. рост грибка на среде	Образование зигот: время в сутк.	Образование зигот: число
Контроль . . .	—	—	—	0	Achromobacter 1	—	—	3	125
Азотобактер . .	+++++	+	—	0	» 2	—	+++	—	0
Клубеньков. бактерии . .	+++++	+	—	0	» 3	+++	—	—	0
B. radiobacter .	++++	—	10	3	» 4	+++	+++	—	0
Ps. tumefaciens .	++++	—	—	0	» 5	+++	++	5	20
Ps. fluorescens 1	+++++	—	—	0	» 6	—	—	7	35
» 3	+++	—	5	55	Microc. albus	+++	—	—	0
» 4	++++	—	3	150	» flavus	+++	—	—	0
» 5	+++	+++	5	60	» citreus	++	+	3	135
» 6	++++	+++	—	0	Mycob. album	++	—	—	0
» 7	+	—	3	180	» citreum	+++	++	5	56
» 8	—	—	3	135	» flavum	++	—	—	0
» 9	—	+++	5	35	Torula rosea	—	—	3	100
» 10	—	—	6	25	Guilliermondella	—	— +	3	120
					S. cerevisiae	— —	++	—	0
					S. globosus	—	—	—	0

Действие бактерий на копуляцию грибка происходит независимо от того, развиваются ли они сами на данной среде или нет. Некоторые из них—Pseudomonas и Achromobacter—хорошо развиваются в мощные стелющиеся по всей поверхности агара колонии, и на поверхности их формируются крупные, хорошо заметные простым глазом зигоспоры. Другие (Pseudomonas 8, 9, 10 и Achromobacter 1 и 6) не растут на указанной среде, но посевной материал оказывает не менее положительный результат на половое воспроизведение грибка.

Из таблицы видно, что агенты, стимулирующие половой процесс и вегетативный рост, не совпадают. Многие микробы, стимулирующие развитие вегетативных органов (воздушного мицелия и спороносцев), вовсе не оказывают влияния на половую функцию того же организма. В присутствии некоторых штаммов азотобактера, клубеньковых бактерий, затем Pseudomonas 6, Achromobacter 2, 4, S. cerevisiae Phycomyces образует хорошо развитый воздушный мицелий и многочисленные спороносцы, но копуляции половых гиф не происходит; с другой стороны, имеются микробы (Pseudomonas 3, 4; Achromobacter 1, 5, 6), которые действуют только на половую функцию грибка. Наконец, имеются и та-

кие организмы, которые активируют и вегетативный рост, и половой процесс грибка (Pseudomonas 5, 9; Achromobacter 5; Mycob. citreum).

Аналогичные опыты мы провели с другим тест-объектом—Schizosaccharomyces. Этот грибок был выделен нами в 1927 г. из слизетечения дуба и находился в лабораторных условиях на питательной среде. За это время он переродился, клетки его почти утеряли способность копулировать, споры образовались партеногенетически.

Эти дрожжи мы высевали на среду Ганзена совместно с микробами, которые активировали половой процесс у грибка Phycomyces. На 5-е сутки производили подсчет копулирующих клеток в культурах. Результат приведен в табл. 2.

Таблица 2

Стимуляция микробами полового процесса у Schizosaccharomyces octosporus

Микроорганизмы	% копул. клеток	Микроорганизмы	% копул. клеток	Микроорганизмы	% копул. клеток
Контроль	0	Ps. fluorescens 1	0	Achromobacter 1	2,8
Torula rosae	1,5	» » 3	0,7	» 2	0
Guilliermondella . .	3,0	» » 6	0	» 4	0
S. cerevisiae	0	» » 7	2,0	Rh. trifolii	0
		» » 8	3,5	Mycob. citreum	0,6
		» » 10	1,7	» album	0
				Microc. citreus	0,3

Как видно из приведенных данных, у дрожжевого грибка явно усиливается половая функция под влиянием некоторых микробов. Усиление полового процесса у дрожжей мы и раньше наблюдали в повседневной лабораторной практике при случайных загрязнениях культур. Когда нужно было восстановить эту функцию, мы обычно выдерживали дрожжи в естественных субстратах (в слизетечении деревьев в почве, в напитках и закваске), где присутствовала разнообразная смесь микробов.

Приведенные опыты показывают, что некоторые микробы естественных субстратов обладают способностью активировать половую функцию низших организмов.

Бактерии, активирующие половой процесс, не теряют своих свойств при 30—60-минутном кипячении. Мы подвергали бактериальную массу (Pseudomonas 3, 4 и Endomyces) нагреванию в кипящей воде от 10 до 60 мин., затем накладывали ее на агар штрихом между посевами плюс- и минус-вариантов грибка Phycomyces. Результат получался тот же, что и в опытах с живыми культурами. При более длительном нагревании, свыше 60 мин., наступает инактивация действующего вещества.

Вещество, стимулирующее половую функцию, выделяется микробами в субстрат. Если с синтетического агара снять выросшую культуру бактерий или дрожжей и на их место посеять варианты плюс и минус грибка, то происходит обильное образование зигот.

Фильтраты жидких культур, полученные через мелкопористые фильтры, при прибавлении к агару побуждают грибок к копуляции и зиготообразованию. Так, например, на среде с фильтратами дрожжей Torula мы имели на 10-е сутки 130 зигот, а при прибавлении фильтрата Ps. fluorescens 4 было 185 зигот; в контроле не было ни одной зиготы. Вегетативного роста грибка также не было ни в том, ни в другом случае.

Вторая серия опытов проведена нами с водными вытяжками бактерий и грибков. 10—15-суточные культуры испытуемых микробов, выросших на обычных питательных средах, снимались шпателем с агара, переносились в колбы, заливались водой и кипятились 15 мин. Полученная взвесь фильтровалась через бумажный фильтр. Фильтрат прибавлялся к расплавленному агару, на котором затем высевался грибок

Phycomyces плюс- и минус-варианты. Мы испытали водные вытяжки культур: дрожжей и бактерий. Результаты этих опытов даны в табл. 3. Как видно из таблицы, водные вытяжки оказывают такое же влияние на копуляцию грибка, как и живые культуры. Степень эффективности водных экстрактов различна, так же как она была различна у живых культур.

Таблица 3

Влияние водных вытяжек микробов на половой процесс у Phycomyces

Вытяжки микробов	Вегетативный рост грибка	Образование зигот	
		время в сутк.	число
Контроль	—	—	0
Torula rosae	—	5	35
Guilliermondella	—	4	75
Ps. fluorescens 1	—	—	0
» » 4	—	3	135
Mycob. citreum	+	5	23
Microc. citreus	++	3	79

Спиртовые эфирные и ацетоновые вытяжки не оказывают никакого влияния на половую функцию грибка.

На основании приведенного мы можем заключить, что некоторые микробы образуют вещество, активирующее половую функцию у низших организмов. Это вещество отличается от веществ, стимулирующих вегетативный рост. Мы его относим к половым гормонам. Этот гормон растворим в воде и не растворим в спирте, ацетоне и в эфире, выделяется из клеток в субстрат и может быть получен в фильтрате.

Образуемое микробами вещество действует специфически на разные организмы. Кроме указанных двух организмов, мы проверяли действие отдельных бактерий Pseudomonas 4, Torula на половую функцию грибков Debaryomyces и Zygosaccharomyces. Эти организмы выделены нами в 1925—1927 гг. С того времени они почти утеряли свою половую функцию, а на среде Ганзена вовсе не копулировали.

После совместного культивирования этих дрожжей с указанными микробами-активаторами они снова приобрели способность копулировать (табл. 4).

Таблица 4

Восстановление половой функции у дрожжей при совместном культивировании их с бактериями-активаторами

Виды дрожжей	% копулирующих клеток		
	в контроле	Pseudom. 4	Torula
Zygosaccharomyces	0	2,3	1,03
Debaryomyces	0	0,1	0,05

У Zygosaccharomyces после нескольких пересевов в смешанных культурах с Pseudomonas 4 количество копулирующих клеток достигало в среднем 2,3%, а в отдельных высевах 3—4%. Слабее восстанавливал эту функцию Debaryomyces 4. Более 0,1% копулирующих клеток мы не получали.

Вещество, активирующее половую функцию у низших организмов, обнаруживается и в некоторых растительных субстратах. Мы выделяли его из солода в виде водной фракции. Один грамм солода обрабатывался водой, взвесь фильтровалась, и фильтрат прибавлялся к указанной

выше среде. Посев на такой среде грибка Phycomyces плюс и минус давал обильное образование зигот.

Такие же вытяжки из бобов и из пептона дали отрицательные результаты. Вместо водных экстрактов мы прибавляли к тем же средам небольшие дозы сусло-агара, бобового агара и МПА, приготовляемых обычным способом. Результат аналогичен предыдущему. Сусло-агар, как таковой, резко стимулирует половую функцию, бобовый агар и МПА, наоборот, подавляют ее.

Впрочем и сусло-агар, если он приготовлен с большой концентрацией сусла, тоже задерживает половую функцию у грибков. Этим, вероятно, и следует отчасти объяснить так называемое перерождение культур в апогамные формы.

Выводы

1. Установлено, что некоторые бактерии, дрожжи и микробактерии образуют вещество, активирующее половую функцию у низших органов. Это вещество рассматривается нами как половой гормон.

2. Половой гормон отличается от гормонов роста или ростовых веществ. Он не стимулирует вегетативных процессов, как это наблюдается с ауксином или витаминами.

3. Гормон половой функции выделяется микробами в субстрат. Его можно экстрагировать водой, он не растворяется в спирте, ацетоне и в эфире.

4. Действие полового гормона распространяется на разные организмы.

5. Половой гормон не только усиливает, но и восстанавливает половую функцию у низших организмов.

Институт микробиологии Академии Наук СССР
Москва

Получено 18.XII. 1944

STIMULATION OF THE SEX PROCESS IN FUNGI BY THE PRODUCTS OF BACTERIAL METABOLISM

N. A. Krassilnikov

Summary

1. It has been established that some bacteria, yeasts, and mycobacteria are capable of forming a substance activating the sex function in the low organisms. This substance is considered by us as a sex hormone.

2. The sex hormone differs from the growth hormones or growth substances. It does not show a stimulating influence upon the vegetative process as this has been observed in respect of auxin or vitamines.

3. The sex hormone is released by bacteria into the substrate. It may be extracted with water.

4. Different organisms are influenced upon by the sex hormone.

5. The sex hormone not only increases, but also restores the sex function in the microorganisms.

Institute of Microbiology of the
Academy of Sciences of the USSR
Moscow

Посвящается Б. Л. Исаченко в связи с 50-летием его научной деятельности

БАКТЕРИИ ГОРЯЧИХ ИСТОЧНИКОВ ХОДЖА-ОБИ-ГАРМ

А. Г. Родина

Горячие источники Ходжа-Оби-Гарм исследовались неоднократно химиками и гидрогеологами (Липский, 1895; эксп. проф. Рагозы, 1930; Уклонский, 1930; Карстенс [2] и др.), но биологических исследований почти не было. Известна лишь работа Закржевского [1], содержащая определение водорослей для наиболее типичных источников. Между тем эти термы для биологов представляют большой интерес. Различные температуры — средняя суточная от 50° до 86° — дают возможность установить «границы жизни» для ряда растительных форм; можно здесь предполагать и своеобразный мир организмов.

В октябре 1944 г. эти термы были исследованы группой сотрудников Гидробиологического отдела Зоологического института Академии Наук СССР. Задачей моей работы было получение ориентировочных данных о своеобразии микробного населения вод, которое вытекает из условий существования бактерий в этих минеральных ключах. Работа включала выяснение качественного состава бактерий источников и распространения отдельных групп в термах с различными температурами. В это время (октябрь 1944 г.) курорт, устроенный на термах Ходжа-Оби-Гарм Наркомздравом Таджикской ССР, не функционировал уже в течение ряда лет. Отсутствие кого бы то ни было из прежнего персонала курорта не позволило воспользоваться ранее установленной нумерацией источников. Поэтому в настоящей статье не указываются номера источников, а только их температура, как главный отличительный признак. Измерения температуры проводились при взятии проб. В это время источники имели следующий вид: наиболее горячие (температура 83—85°) вытекали из неглубоких ниш небольшими струями, сливающимися в мелком резервуаре с песчаным дном, переливаясь через который, вода образовывала ручей, увеличивающийся дальше вследствие присоединения воды других источников, выходы которых были расположены слева и справа от ложа этого ручья. Ниже ручей давал несколько водопадов. На боковых стенках ниш как самых горячих источников, так и источников ниже по ручью у уреза воды были во многих местах отложения серы. Вдоль по ручью на дне тех ниш, где температура воды не превышает 68,0°, наблюдались сплошные ковры синезеленых водорослей. Местами эти водоросли образуют громадные толстые пласты различных цветов. Температура воды в ручье менялась, она то падала местами до 53—59°, то вновь повышалась вследствие притока более горячей воды. Ниже выходов источников температура воды в ручье постепенно понижалась и уже к первому водопаду она была равна 43°.

Выше самых горячих источников имелись два источника с очень малым дебитом и с более низкой температурой воды: 1) от + 49,5 до 50,0°, 2) + 53°. Оба источника сочатся прямо из земли, образуя небольшие размывы и давая маленькие ручейки с пониженной температурой воды: 1) до + 30°, 2) до + 40,0°. Как и в других источниках, и здесь обильный рост синезеленых, но в токе воды поверх них серовато-белые скопления нитей. Наличие таких нитей было отмечено еще лишь в одном месте

по ходу основного ручья, где температура воды была равна 52°. Кроме этих групп источников, ниже их и на некотором от них расстоянии было еще несколько групп выходов из-под наносных пород. Температура источников была 59, 66, 68, 72, 73 и 77°. Здесь имело место особенно сильное развитие синезеленых водорослей по бокам ручья, образованного слиянием этих источников и имевшего температуру 59—60°. Местами размеры пластов синезеленых измерялись метрами. Цвет менялся, он был или различных оттенков зеленого или розового и мясо-красного. На стенках и потолках ниш этой группы, как в большинстве верхних, были отложения солей. Но отложений серы или наличия серовато-белых нитей серобактерий здесь отмечено не было.

Для выяснения наличия бактериального населения в этих термах, во всех описанных выше вкратце источниках, в нескольких местах по течению ручья, в пластах синезеленых на разных уровнях, в грунтах ниш и по ручью были поставлены предметные стекла для получения пластинок обрастания. Стекла были специальным образом обработаны. Стекла выдерживались трое суток, после чего были вынуты, высушены и фиксированы спиртом. Вторая серия пластинок обрастания была поставлена в ноябре по моей просьбе аспирантом института Е. Ф. Мануйловой.

Кроме этих двух серий пластинок, мной было собрано большое количество проб воды из источников с различной температурой, грунтов как из ниш, так и по течению ручья, наплывов на боковых стенках, отложений серы, верхних слоев потолков ниш, находящихся под постоянным воздействием паров источников и пластов синезеленых водорослей по слоям. Общее число проб было равно 54. Часть посевов водой была сделана на курорте, и они поставлены в ниши, имеющие соответственную температуру, все остальные—в Сталинабаде. Посевы водой производились следующим образом: в относительно большой объем воды вливалось небольшое количество соответственно сгущенной среды. Посевы остальными пробами производились на среды, приготовленные на минеральной воде источников.

Основной вопрос — развиваются ли бактерии в воде источников при столь высоких температурах—должны были разрешить пластинки обрастаний (в моем распоряжении не было термостатов столь высокой температуры). К сожалению, стекла, поставленные в самых горячих источниках, не уцелели, очевидно, они были вынуты кем-нибудь из местного населения. Таким образом, были получены пластинки обрастания при температуре от 40,5 до 77°. Оказалось, что нет стекол, на которых отсутствовали бы микробы, бактериальная жизнь шла при всех указанных температурах, даже непосредственно у самого выхода источников. Интенсивность бактериального роста, однако, была различна. На стеклах, стоявших в воде, резко заметна была зона отложения солей на линии воды, и здесь в этой зоне была резко выделявшаяся полоса обрастаний. Ниже на погруженной части стекла были отдельные скопления и колонии бактерий. Усиленное размножение микробов на границе воды могло быть вызвано, с одной стороны, наличием, несомненно, более низкой температуры на этой линии, а с другой — и более высокой аэрацией. Микрофлора обрастаний в воде была представлена исключительно палочками разнообразного вида и размеров. Были колонии тонких длинных палочек с гомогенной протоплазмой, и коротких толстых с зернистым клеточным содержанием, и очень мелких и изогнутых палочек типа Microspira. На стеклах, стоявших в грунтах, обрастания были еще обильнее, — все стекла были покрыты сплетениями разнообразных палочек.

В источниках с более низкой температурой к бактериям присоединялись водоросли, а местами и азотобактероподобные клетки.

Пластинки, стоявшие в пластах синезеленых, во всех их слоях представляли сходную картину: в густой сети водорослей были расположены в большом количестве разнообразные палочки и среди них было огромное

количество нитей, состоящих из тонких палочек, и азотобактероподобные клетки. Эти клетки (по-видимому, Azotobacter) встречались довольно часто и на стеклах из протоков, текущих среди мощных пластов синезеленых (табл. 1).

Развитие бактерий на пластинках обрастания показало с несомненностью, что в воде терм при столь высоких температурах бактериальная жизнь не только сохраняется, но и развивается.

Пластинки обрастания показали также, что характерным для горячих источников Ходжа-Оби-Гарм является отсутствие обычной кокковой флоры. Это обстоятельство подтвердили препараты, приготовленные из всех проб грунтов, отложений и пластов синезеленых водорослей в возможно скором времени после их выемки. Препараты просматривались как в неокрашенном, так и в окрашенном эритрозином виде. И здесь оказалось, что микрофлора горячих источников представлена почти исключительно палочками; в части проб, кроме них, был Azotobacter (или ему подобные клетки). Грунты более холодных источников содержали кокки (табл. 2). Во всех препаратах встречалось довольно большое количество спор, которые отсутствовали на пластинках обрастаний.

Просмотр препаратов показал различие в количестве бактериального населения грунтов в зависимости от их состава. Чисто песчаные грунты источников, имевших высокую температуру, были относительно бедны бактерия-

Таблица 1

Развитие бактерий на пластинках обрастания в минеральных источниках Ходжа-Оби-Гарм (3-я суточная экспозиция, выборочные данные)

Вода источников с температурой						Вода стока		Грунты источников	
79°	77°	74°	73°—67°	60°	56°	главного источника, $t+62°$	боковой группы источников, t 58°	пласты синезеленых водорослей	песчаный, t воды 82°	песчаный с примесью иловатых частиц, t воды 53°
Скудный рост	Хороший рост	Хороший рост	Пышный рост	Пышный рост	Относительно скудный рост	Скудный рост	Хороший рост	Пышный рост	Скудный рост	Пышный рост
На линии воды отложения солей, среди них единичные палочки, ниже небольшие группы разнообразных палочек	На линии воды скопления тонких длинных палочек, под водой отдельные колонии разнообразных палочек	Разнообразные палочки покрывают все стекла, образуя мелкие колонии и сплетения	Стекла покрыты сплетениями и колониями разнообразных палочек	Скопления разнообразных палочек, местами азотобактероподобные клетки		Крупные палочки с биполярными тельцами и очень мелкие палочки рассеянный рост	Стекла покрыты большим количеством водорослей и разнообразных палочек, среди которых есть спороносные. Местами азотобактероподобные клетки	Густая сесть синезеленых. Среди них масса разнообразных палочек, длинных нитей и азотобактероподобные клетки	Небольшое количество палочек	Разнообразные палочки, среди них много изогнутых типа Microspira. Единичные водоросли

Состав бактериальной флоры грунтов терм

1	2	3	4	5	6
Место взятия пробы	Дно резервуара наиболее горячего источника	Грунт источника боковой группы	Грунт стока наиболее горячего ключа	Грунт источника боковой группы	Грунт источника основной группы
Температура воды ° С	83°	77°	74°	68°	67°
Характер грунта .	Мелкий песок с примесью мелких камешков и илистых частиц	Песок, мелкий гравий и илистые частицы	Отложения серо-черного цвета, состоящ. из песка, илистых частиц, отмерших водорослей	Песок, мелкий гравий и илистые частицы	Песок, мелкий гравий и илистые частицы
Характер бактериального исследования (мазок, окраска эритрозином) .	Небольшое относительно число различных палочек	Незначительное содержание бактерий. Разнообразные палочки, среди которых есть спороносные	Значительное содержание бактерий. Разнообразные палочки, среди которых есть типа Microspira	Большое количество бактерий. Разнообразные палочки, азотобактероподобные клетки	Большое содержание бактерий: различные палочки
Бактерии, растущие на МПА	+	+	+	+	++
Десульфурирующие .	+	—	+	+	++
Тиобактерии (Thiob. thioparus)	—	—	+	—	—
Денитрифицирующие с окислением (Thiob. denitrificans) .	—	—	++	++	++
Денитрифицирую., восстановл. серноватистокислые соли	—	—	—	—	—
Серобактерии . . .	—	—	—	—	—
Денитрифицирующие	—	+	+	+	+
Азотфиксирующие: Azotobacter	—	—	—	—	—
Азотфиксирующие: Clostridium Pasteurianum	—	+	+	+	+

Таблица 2

Ходжа-Оби-Гарм (выборочные данные)

7	8	9	10	11	12
Грунт источника боковой группы	Грунт 1-го верхнего источника	Грунт 2-го верхнего источника	Грунт ручья, образованного стоками главной группы	Грунт стока 2-го верхнего источника	Грунт под пластами синезеленых на стоке боковых групп
59°	53°	49,5°	52,5°	30°	
Песок, мелкий гравий, илистые частицы, водоросли	Песок с мелким гравием	Песок, мелкий гравий, илистые частицы и перегнившие остатки растений	Песок, мелкий гравий, илистые частицы	Мягкий грунт черного цвета с преобладанием илистых частиц и перегнивших водорослей	Илистые частицы с большим содержанием перегнивших остатков водорослей. Примесь песка и мелкого гравия
Большое количество разнообразных палочек	Относительно незначительное содержание бактерий, преобладают тонкие зернистые палочки	Большое содержание микробов, представл. разнообразными палочками	Незначительное количество различных палочек	Колоссальное содержание бактерий. Различные палочки, кокки, азотобактероподобные клетки	Колоссальное содержание бактерий. Разнообразные палочки и азотобактероподобные клетки. Встречаются кокки
+	++	++	++	++	++
—	—	+	++	++	++
—	++	++	++	++	++
++	++	+	+	+	++
—	—	—	—	+	+
—	—	—	—	+	—
+	+	+	+	+	++
—	—	—	+	+	+
+	+	+	+	+	+

ми, в то время как грунты с примесью иловатых частиц содержали их значительно больше, а серовато-черные, богатые органическим веществом слои под пластами водорослей содержали их колоссальное количество.

Для выяснения качественного состава бактериальной флоры источников были проведены посевы на различные элективные среды как водой источников, так и пробами грунтов, натеков на стенках, отложений серы, кусочками, взятыми из пластов синезеленых. Было проведено определение наличия всех групп круговорота серы, почти всех (за исключением нитрификации вследствие отсутствия у меня $MgCO_3$) процессов круговорота азота, присутствия бактерий, растущих на органических средах (МПА) и разлагающих клетчатку (аэробов и анаэробов).

Произведенные посевы показали, что как вода всех источников, так и грунты содержат термофильные бактерии, растущие на органических средах. Бактерии эти не развивались при комнатной температуре (+ 23°). Большинство из них было выделено в чистые культуры. Число видов было невелико (15), причем оказалось только 4 штамма неспороносных палочек; остальные же были различные спороносные виды. Большинство из них обладало способностью выделять H_2S из органических веществ. Никаких других групп в воде большинства источников, имеющих температуры выше 68°, не было ообнаружено. Исключение представляет развитие денитрифицирующих с окислением серы бактерий в посевах водой источника, имевшего температуру + 79°. В ряде источников с температурой более 70° были обнаружены десульфурирующие бактерии. В воде же источников, где температура воды была ниже 68°, было обнаружено разнообразное бактериальное население; кроме микробов, растущих на органических средах, денитрифицирующие, денитрифицирующие с окислением серы бактерии, десульфурирующие, тиобактерии (типа Thiobacillus thioparus), а в воде, стекающей со скалы, сплошь покрытой ковром водорослей (температура 25°), и азотфиксирующие (Azotobacter и Clostridium Pasteurianum) (табл. 3).

Ни в одном случае, ни в посевах водою, ни в посевах грунтами или кусочками пластов синезеленых (даже из тех участков, где водоросли отмирают и разлагаются) не было получено развитие бактерий, разлагающих клетчатку бактерий. Это следует объяснить не отсутствием этих форм в термах Ходжа-Оби-Гарм, чего нельзя предположить, а, очевидно, какими-то недочетами в питательной среде. Причина отсутствия роста осталась невыясненной.

Значительно более богатое бактериальное население оказалось в грунтах источников под горячей минеральной водой. Даже в резервуаре, где скапливалась вода из наиболее горячих ключей, где температура воды была равна 83°, были обнаружены две группы бактерий: 1) развивающиеся на органических средах и среди них выделяющие при этом H_2S и 2) десульфурирующие. Обе эти группы являются наиболее широко распространенными. Microspira была обнаружена и в песчаных грунтах, и грунтах, богатых органическим веществом, в отложениях серы, — в источниках с высокой и относительно низкой температурой. Активность этих форм из терм Ходжа-Оби-Гарм значительна, полное почернение осадка отмечалось в посевах через 48 часов. В третьем пересеве было определено выделение H_2S — от 294 до 370 мг на 1 л (на среде ван-Дельдена).

Широко распространены денитрифицирующие с окислением серы бактерии, обнаруженные в грунтах источников с температурой 25, 30, 53, 59, 73, 74°. Эта группа давала пышный рост, сопровождающийся выделением газов и в последующих пересевах. На агаре развивались мелкие колонии бактерий типа Thiobacillus denitrificans.

В нескольких случаях в посевах грунтами (среда Lieske) развились денитрифицирующие, восстанавливающие серноватистокислые соли бак-

Таблица 3

Состав бактериальной флоры воды источников Ходжи-Оби-Гарм

Место взятия пробы	Наиболее горячий источник	Источник главной группы	Источник боковой группы № 2	Источник боковой группы № 6	Источник боковой группы № 4	Источник боковой группы № 1	1-й верхний источник	2-й верхний источник	Ручей основной группы	Вода, стекающая со скалы из верхних источников
Температура воды ° С	83°	79°	77°	73°	68°	59°	53°	49,5°	59°	25,5°
Бактерии, растущие на МПА . . .	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
Десульфурирующие	—	—	—	+	+	++	++	++	++	++
Тиобактерии (Thiob. thioparus) . .	—	—	—	—	—	++	++	+	+	+
Денитрифицирующие окислением серы (Thiob. denitrificans) . . .	—	+	—	—	—	+	+	+	+	+
Денитрифицирующие, восстанавлив. серноватистокислые соли . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Денитрифицирующие	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
Азотфиксирующие (Azotobacter, Clostridium, Pasteurianum)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+

Условные обозначения: — отсутствие роста
+ рост
++ пышный рост

терии. Развитие их наблюдалось лишь в посевах пробами грунтов источников с относительно низкой температурой — 25,5 и 30,0° и под пластами синезеленых водорослей. Вряд ли их можно отнести к термофильным бактериям этих терм.

Довольно часто в грунтах были обнаружены тиобактерии типа Thiobacillus thioparus. Следует отметить, что здесь имелись термофильные формы, не дававшие роста при комнатной температуре при одновременно произведенных посевах, в то время как в термостате при 42° наблюдался пышный рост их с образованием толстой желтой от обильного выделения серы пленки.

Развитие истинно денитрифицирующих бактерий было скудным, несмотря на внесение относительно значительных количеств посевного материала. В ряде случаев роста не было совершенно.

Azotobacter в посевах грунтами не давал развития, за исключением одного случая. Clostridium Pasteurianum был обнаружен почти во всех посевах грунтами, но процесс протекал очень вяло.

Отдельно следует рассмотреть пробы отложений, взятых с боковых стенок в местах, где наблюдались отложения серы. При просмотре препаратов, приготовленных из этих проб, были обнаружены капли и кристаллы серы среди значительного количества мелких палочек, изогнутых палочек, а в одном случае и нитей серобактерий. Мазки эти во многих случаях напоминали картину, наблюдаемую в нечистых культурах тиобактерий, имеющих уже значительные сроки культивирования. Тиобактерии неизменно развивались при посеве этим материалом, причем на стенках и дне колб наблюдался обильный желтоватый налет отложений серы, на поверхности были пленки бактерий с обильным содержанием в них капельной и кристаллической серы. В пересевах на агар развивались

колонии характерного для Thiobacillus thioparus вида. При таком постоянном наличии тиобактерий в отложениях серы у источников встает вопрос о ее происхождении в термах. Отложения эти наблюдались, как уже указывалось выше, у воды на боковых стенках ниш источников, иногда на камнях, на дне протоков. Сера эта может быть биогенного происхождения, в пользу чего говорит наличие в отложениях серы бактерий, выделяющих эту серу в результате своей жизнедеятельности. Влажность субстрата, где имеются отложения, непрерывный приток минеральных солей, теплота вследствие подогревания водой и в то же время более низкая, несомненно, температура — все это факторы, благоприятствующие росту и активности здесь бактерий; Хрисанфов и Жуков [4] рассматривают эти отложения как самоосадочные. Наличие в воде источников свободного H_2S, конечно, может иметь следствием осаждение серы в результате окисления его кислородом воздуха. Но в пользу биогенного происхождения серы говорит, во-первых, незначительное содержание H_2S в воде источников, расположение отложений серы не равномерно у выхода, а островками на определенных местах, наличие в них весьма активных тиобактерий.

Из других групп круговорота серы в этих образцах были найдены: выделяющие H_2S из органических веществ, десульфурирующие, денитрифицирующие, для которых источником энергии является сера, и в 3 из 5 образцов денитрифицирующие, восстанавливающие серноватистые соли. Истинных денитрификаторов в этих образцах, как равно и других групп круговорота азота, найдено не было. В то же время натеки на скалах по бокам источника, непосредственно над ним, где не было отложений серы, содержали и все указанные группы круговорота серы и бактерий круговорота азота: денитрифицирующих и азотфиксирующих (табл. 4).

В пробах, взятых с потолков ниш, находящихся под постоянным воздействием паров источника, где развиваются островками синезеленые водоросли, оказалось также богатое бактериальное население, представленное теми же группами.

Как уже указывалось выше, лишь в двух местах — в стоках источников, где температура воды была 49°, и в одном только месте, в ручье (температура 52°) — были отмечены серовато-белые нити серобактерий, оказавшиеся близкими Beggiatoa leptomitiformis, тонкие длинные нити с зернистым содержанием и мелкими редкими включениями серы. Кроме них, здесь были в значительном количестве капли серы и различные палочки. В посевах развились тиобактерии. Пурпурные бактерии не были обнаружены, несмотря на тщательные поиски их. Они развились лишь в культурах накопления, где в цилиндрах дали ясно видимый мутный слой бледнорозоватого цвета. Этот слой состоял из Chromatium varmingii, Chromatium vinosum, Thiospirillum rosenbergii.

Такое незначительное количество пурпурных бактерий в источниках, явно угнетенное состояние бесцветных серобактерий указывают на то, что эта группа не находит в этих источниках благоприятных условий для своего развития.

Пласты синезеленых водорослей, развивающиеся по стокам минеральной воды, местами занимающие пространства, измеряемые метрами, содержат в себе богатую бактериальную флору. Здесь имеют возможности роста и гнилостные, и десульфурирующие, и денитрифицирующие. В части проб обнаружены группы денитрифицирующих, источником энергии для которых являются соединения серы. Но наибольший интерес представляет широкое распространение в этих пластах азотфиксирующих бактерий: Azotobacter и Clostridium Pasteurianum. Azotobacter находится в таком значительном количестве, что был обнаруживаем при простом микроскопическом просмотре мазков из этих пластов. В культурах Azotobacter давал толстую небуреющую пленку. Факт развития азотфиксирующих бактерий вместе с синезелеными водорослями заслуживает быть

Таблица 4

Качественный состав бактериальной флоры различных отложений терм Ходжи-Оби-Гарм (выборочные данные)

Место взятия пробы	Отложения серы на стенке				Натеки на скале сбоку от источника основной группы	Примечание
	наиболее горячего ключа с t воды 85°	источника основной группы с t воды 79°	источника основной группы с t воды 77°	источника основной группы с t 76°		
Характер бактериального населения (мазки, окрашенные эритрозином)	Разнообразные палочки среди капель и кристаллов серы	Разнообразные палочки в значительном количестве среди капель и кристаллов серы	Масса разнообразных палочек среди капель и кристаллов серы	Разнообразные палочки, среди которых были очень тонкие и длинные с крупными включениями капли и кристаллы серы	Колоссальное содержание бактерий, главн. обр. различных палочек. Азотобактероподобные клетки	Температура самих отложений не могла быть определена за отсутствием соответствующих приборов
Бактерии, растущие на органич. средах (МПА)	—	+	+	+	+	
Десульфурирующие	—	+	—	+	+	
Тиобактерии (Thiob. thioparus)	—	+		+	+	
Денитрифицирующие с окислением серы (Thiob. denitrificans)	—	+	+	+	+	
Денитрифицирующие, восстановл. серноватистокислые соли	+	—	+		—	
Денитрифицирующие	—	+	—	+	+	
Азотфиксирующие Azotobacter . . .	—	—	—	—	+	
Clostridium Pasteurianum	—	—		—	+	

отмеченным. Здесь нашло подтверждение предположение академика Б. А. Келлера [3], что «в качестве первых пионеров растительности на продуктах выветривания горных пород сильное развитие получают синезеленые водоросли, по всей вероятности, с азотусвояющими бактериями...» Келлер считает, что крупная биологическая проблема — использование солнечной энергии и получение органогенов C и N — решена была в отдаленной геологической древности в первоначальных древних фитоценозах синезеленых водорослей и азотусвояющих бактерий. Можно предполагать, что этот симбиоз и позволяет водорослям получать такое мощное развитие на термах Ходжа-Оби-Гарм.

Выводы

1. Термофильные бактерии живут и размножаются в воде названных терм, на что указывает рост их на пластинках обрастания.

2. Бактериальная флора наиболее горячих ключей бедна по своему составу. В воде источников с температурой более 80° обнаружены были

лишь спороносные палочки. В источниках с более низкой температурой воды количество групп бактерий увеличивается (табл. 3).

3. Грунты источников и натеки на стенках ниш имеют богатую и разнообразную бактериальную флору (табл. 2).

4. Отложения серы сбоку от струй воды всегда содержали тиобактерии в активном состоянии.

5. Серобактерии не находят в термах Ходжа-Оби-Гарм благоприятных условий для своего развития. Нити бесцветных серобактерий, представленные одним видом, имели очень ограниченное распространение. Пурпурные, опять-таки бедные видами (всего 3), были обнаружены лишь в накопительных культурах.

6. Огромные пласты синезеленых, развивающиеся по стоку воды минеральных источников, имеют богатую и разнообразную бактериальную флору. Здесь должно быть отмечено широкое развитие азотфиксирующих бактерий.

Зоологический институт
Академии Наук СССР
Гидробиологический отдел

Получено 16.IV. 1945

ЛИТЕРАТУРА

1. Закржевский Б. С. О термофильных дробянках горячих источников Таджикистана. Бюлл. Ср.-Аз. ун-та, вып. 19, 1934.
2. Карстенс Э. Э. Термы Таджикистана. Сб.: «Термы и газы Тянь-Шаня». Изд. Акад. Наук СССР, стр. 47, 1938.
3. Келлер Б. А. Основы эволюции растений. Изд. Туркмен. фил. АН СССР. Ашхабад, 1943.
4. Хрисанфов Н. Е. и Жуков Г. И. Лечебные местности Таджикистана, стр. 45, 1934.

BACTERIA OF THE HODJA-OBI-GARM HOT SPRINGS

By *A. G. Rodina*

Summary

1. Thermophylic bacteria live and multiply in the water of these thermal springs as their growth on the plates of overgrowing shows.

2. The bacterial flora of the more hot springs is poor. In the water of the springs the temperature of which was over 80°C only spore-bearing rods were found. In the springs the temperature of which was lower the number of bacterial groups encountered is greater (Table 3).

3. The bottom-grounds of the springs and the sedimentations on the walls of the niches have an abundant and various bacterial flora (Table 4).

4. Sulphur sedimentations forming along the water stream always contained thiobacteria in active condition.

5. Thiobacteria do not find favourable conditions for their growth in the springs of Hodja-Obi-Garm. The threads of the colorless thiobacteria, represented by only one species are but rarely encountered. Only three species of purple bacteria were found and that only in enriching cultures.

6. The great layers of cyanophycea developing along the water flow of the mineral springs have a rich and various bacterial flora. An abundant development of the nitrogen-fixing bacteria observed here is to be mentioned.

Zoological Institute of the
Academy of Sciences of the USSR

ВЛИЯНИЕ РОСТОВЫХ ВЕЩЕСТВ НА АЦЕТОНО-ЭТИЛОВЫЕ БАКТЕРИИ

II. ОТНОШЕНИЕ БАКТЕРИЙ К БИОТИНУ, ТИАМИНУ И ПАРА-АМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЕ

Н. Д. Иерусалимский

В первом сообщении [3] было показано, что из числа 14 испытанных нами витаминов и близких к ним веществ стимулирующее влияние на рост ацетоно-этиловых бактерий производят три соединения: биотин, *p*-аминобензойная кислота и тиамин (витамин B_1) или же его пиримидиновый компонент. На синтетических глюкозно-аммонийных средах с добавкой этих веществ бактерии развиваются, без них — роста нет.

Цель настоящей работы — уточнить ростовой эффект каждого из этих ростовых веществ в отдельности.

Методика

Состав основной среды оставался тем же, что и в первом сообщении [3]: кроме необходимых солей, она содержала сахар и в качестве источника азота — 0,1% NH_4Cl. Чтобы устранить примеси ростовых веществ, глюкоза была обработана норитом и перекристаллизована из спирта. В некоторых опытах употреблялась химически чистая сахароза фирмы Schering.-Kahlbaum (Saccharose reinst), имеющая вид крупных кристаллов — до 2 см в поперечнике. И на том и на другом сахаре в концентрациях от 0,5 до 5% реакция бактерий на добавку ростовых веществ была одинаковой, что говорит за отсутствие в них примеси каких-либо «факторов роста». Неочищенная глюкоза, как оказалось в дальнейшем, содержит следы биотина.

Пара-аминобензойную кислоту, тиамин и его компоненты мы имели в кристаллическом виде. К сожалению, в нашем распоряжении был только биотин в виде сиропообразного концентрата, содержащего 200 γ биотина в 1 см³ и гарантированного в отсутствии витаминов группы В (фирма S. M. A. Corporation). Не исключена, однако, возможность, что в этом концентрате имеются примеси других ростовых веществ.

Опыты ставились параллельно и на другом препарате биотина, полученном нами из яичных желтков по Kögl'ю [6] путем следующих последовательных операций: экстракция кипящей водой, осаждение балластных веществ ацетоном, извлечение биотина 80% спиртом, очистка его свинцовым уксусом, осаждение фосфорно-вольфрамовой кислотой, адсорбция животным углем, элюация 60% ацетоном + NH_3 и высушивание в вакууме. Применявшиеся методы очистки гарантируют освобождение полученного препарата от тиамина и *p*-аминобензойной кислоты, но примесь каких-нибудь других неизвестных ростовых веществ вполне возможна. Впрочем, тот факт, что оба препарата, полученные разными методами и из разных источников, вполне заменяли друг друга и показывали активность в чрезвычайно больших разбавлениях, говорит нам, что главным действующим началом их является биотин, а не случайные примеси. О том же говорят опыты с авидином, изложенные ниже.

Прежде чем перейти к экспериментальным данным, необходимо также остановиться на применявшейся нами методике прямого счета бактерий. Этот метод представляет собой разновидность метода Дрейера и Королева [4]. В качестве стандарта служила суспензия дрожжей Torula rosea, окрашенная по Граму и содержащая $30 \cdot 10^6$ клеток в 1 см³. Дрожжи, смытые с поверхности агара возможно меньшим количеством воды, смешивались с 3—4 объемами карболового генциан-виолета, после 1—2-суточного стояния отфильтровывались на стеклянном фильтре Шотта № 4, дополнительно обрабатывались раствором Люголя и раствор отфильтровывался. Осадок дрожжей заливался несколькими см³ спирта. Через 1 мин. добавлялось столько воды, чтобы разбавить спирт до 10%, жидкость отфильтровывалась, осадок промывался и затем размешивался в 3% растворе карболовой кислоты. На основании просчета в счетной камере суспензия дрожжей разбавлялась до указанной выше концентрации.

Из исследуемых культур в нужный момент отбиралось в пробирки по 0,5 см³ жидкости (при содержании бактерий меньше $10 \cdot 10^6$ в 1 см³ — по 1 см³ жидкости) и к каждой пробе добавлялось по 2 капли 70% раствора фенола, содержащего 2% эритро-

зина. Пробы нагревались на водяной бане до 90—95° и оставлялись в горячей воде до ее остывания. Закрытые каучуковыми пробками, эти пробы могут сохраняться неограниченно долго. Перед просчетом в каждую пробу вносилось по 0,5 см³ стандартной суспензии дрожжей, и, после энергичного встряхивания в течение 1 мин., с помощью платиновой петли отбиралась небольшая капля. Капля просматривалась под микроскопом. В том случае, если при поверхностном просмотре соотношение бактерий с дрожжами превышает 5 : 1, к смеси в пробирке добавляют еще 0,5 см³, 1 см³ или больше дрожжевой суспензии, в расчете получить соотношение бактерии — дрожжи, лежащее в пределах 0,5—5. Затем после нового сильного взбалтывания небольшую каплю смеси (около 0,02—0,03 см³) размазывают по предметному стеклу на площади в 1—2 см², подсушивают и фиксируют в пламени. Затем на мазок наносят несколько капель дестиллированной воды и осторожно отсасывают ее фильтровальной бумагой, чтобы удалить избыток краски. После этого производят просчет числа дрожжей и бактерий в каждом поле зрения, суммируют те и другие числа, находят соотношение бактерий и дрожжей, а отсюда, учитывая соотношение взятых объемов культуры и суспензии дрожжей, без труда можно вычислить содержание бактерий в 1 см³ среды по формуле: $x = K \times \frac{a}{b} 30 \times 10^6$, где x — искомое содержание бактерий, K — отношение бактерий: дрожжи в препарате, a — объем дрожжевой суспензии, b — объем бактериальной пробы (0,5 или 1 см³) и $30 \cdot 10^6$ — титр стандартной дрожжевой суспензии. Чтобы иметь хорошо сходящиеся повторимые результаты с погрешностью, не превышающей 5%, необходимо сосчитать не меньше чем 250—300 дрожжевых клеток. Обычно для этого бывает достаточно 25—40 полей зрения.

Преимущества указанной модификации прямого счета перед обычной заключаются, во-первых, в том, что применяемые здесь дрожжи мельче, чем Sac. Pombe, и поэтому не закрывают собой бактерий; во-вторых, добавка во взятые пробы карболовой кислоты освобождает от необходимости немедленно осуществлять более длинную операцию смешивания со стандартной суспензией дрожжей и поэтому позволяет в короткий срок взять большое число разных проб; в-третьих, покраска эритрозином бактерий в жидкости более быстра и устраняет всякие возможности для смывания клеток со стекла, что может случиться при обычном способе покраски подсушенного мазка.

Метод позволяет с достаточной точностью определить содержание бактерий в пределах от 5 до 2 000 и более миллионов на 1 см³. Средняя погрешность определения равна ± 5,2%, максимальная погрешность не превышает 10—12%.

Экспериментальная часть

1. Выяснение незаменимости ростовых веществ ацетоно-этиловых бактерий

Прежде всего следовало выяснить, какие из найденных ростовых веществ ацетоно-этиловых бактерий являются незаменимыми «факторами роста» и какие из них только стимулируют развитие, но бактерии могут развиваться и в их отсутствие. Для решения вопроса ставились опыты в пробирках с 6 см³ синтетической среды и добавками тех или иных ростовых веществ. Культура для заражения опыта выращивалась на синтетической среде с минимальными дозами ростовых веществ. Посев первоначально производился петлей. Позже выяснилось, что этот способ не гарантирует внесения равного количества клеток, и поэтому в дальнейшем для посева инокулят разбавлялся в 10 раз, и из него в каждую пробирку пипеткой вносилось точно по 0,05 см³, т. е. около 0,08% от исходного инокулята. Разбавление культуры было $\frac{6 \times 10}{0{,}05} = 1\,200$ раз. При таком сильном разбавлении ростовые вещества культуры не могли оказать никакого влияния на жизнедеятельность бактерий в опытных пробирках. Развитие бактерий учитывалось по микроскопированию и по внешним признакам, как помутнение среды, газовыделение и ослизнение осадка мела на дне.

Многочисленные опыты подобного рода давали одинаковые результаты. Типичные данные приведены в табл. 1.

Таблица 1 ясно указывает на различную биологическую роль трех витаминов. Ни со смесью тиамина и *p*-аминобензойной кислоты, ни с каждым из этих веществ в отдельности развитие бактерий невозможно. Напротив, одного биотина достаточно, чтобы вызвать развитие. В пробир-

Таблица 1

№ п/п.	Добавление в синтетическую среду в начале γ/см³	Развитие на 2-й день	Дополнительные добавления на 2-й день	Развитие на 4-й день
1	Нет	—	Нет	—
2	»	—	Биотин 0,001	±
3	Биотин 0,001	±	Нет	+
4	Тиамин 0,01	—	»	—
5	» 0,01	—	Биотин 0,001	+
6	*p*-аминобенз. к-та 0,001	—	Нет	—
7	» » 0,001	—	Биотин 0,001	+
8	Биотин + тиамин	+	Нет	+
9	Тиамин + *p*-аминобенз. к-та	—	»	—

ках, в которых два дня не было роста (№№ 2, 5, 7), после внесения биотина рост немедленно начинался. Бактерии, следовательно, оставались живы, но отсутствие этого необходимого «фактора роста» препятствовало их росту и размножению. Но в то же время с одним биотином (№№ 2 и 3) развитие шло несомненно слабее, чем с биотином в совокупности с другими ростовыми веществами (№№ 5, 7 и 8). Роль последних, как необязательных стимуляторов роста, вполне очевидна. Повидимому, ацетоно-этиловые бактерии способны их синтезировать сами, но делают это недостаточно быстро.

О способности бактерий восполнять недостающие в среде стимуляторы роста говорит тот факт, что при длительном культивировании (6 пассажей) на синтетической среде с одним биотином не наблюдается никакого вырождения бактерий и после высева на картофельный затор они проявляют нормальную бродильную активность.

О незаменимости биотина говорит также опыт с добавлением авидина. Как известно из работ последних лет [5, 7], авидин представляет собой фракцию яичного белка, обладающую специфическим сродством к биотину. Связанный авидином биотин становится неактивным. При автоклавировании авидин свертывается и освобождает биотин. Мы располагали концентратом авидина фирмы S. M. A. Corporation с активностью в 50 единиц. Опыты ставились в пробирках с синтетической средой и различными добавками.

Таблица 2

№ п/п.	Добавление в синтетическую среду γ/см³				Развитие бактерий по дням			
	тиамин	*p*-амино-бенз. к-та	биотин	авидин	1	2	3	4
1	0,1	0,001	—	—	—	±	—	—
2	0,1	0,001	0,001	—	+	+ + +	+	+
3	0,1	0,001	0,001	125 непрогр.	—	—	—	—
4	0,1	0,001	0,001	125 автоклав.	±	+	+	+

Один из типичных опытов в табл. 2 показывает, что без биотина (№ 1) развития, как обычно, нет. Слабые следы газовыделения на 2-й день обусловливаются, повидимому, биотином, внесенным с инокулятом. В среде с авидином после автоклавирования при 1 атм. (№ 4) идет нормальное развитие; оно несколько слабее, чем без авидина (№ 2), что зависит от воздействия высокой температуры на сахар (легкое пожелтение среды). Но с непрогретым авидином (№ 3) не замечалось ни малейшего признака развития. Эти опыты показывают, что биотин — обязательный фактор роста.

2. Сравнительная активность тиамина и его компонентов

Располагая строго синтетической средой, было желательно уточнить активность компонентов тиамина. Опыты ставились в пробирках с синтетической средой, в которую тиамин или его компоненты вносились в эквивалентных количествах. Периодически брались пробы для просчета бактерий.

Результаты одного из опытов (табл. 3) ясно показывают, что активность пиримидинового компонента не отличается от активности целой молекулы тиамина. Напротив, тиазол не дает никакого ускорения размножения против контроля, т. е. в качестве ростового вещества он абсолютно неактивен.

Таблица 3

Добавление в синтетическую среду + 0,01 γ/см³ биотина	Число бактерий в миллионах на 1 см³, часы		Во сколько раз возросло число бактерий от 26 до 50 час.
	26	50	
—	24	33	1,4
0,01 γ/см³ тиамина	30	300	10,0
0,0068 γ/см³ пиримидина . . .	37	403	10,9
0,0048 γ/см³ тиазола	26	40	1,5

Посев платиновой петлей привел к тому, что в разные пробирки попало не вполне одинаковое число клеток и, повидимому, этим вызвана разница в числе бактерий на 26-м часу. В другом опыте (табл. 4) посев делался пипеткой, как было указано ранее. Кроме того, в инокуляте содержалось 0,001 γ/см³ тиамина и 0,0001 γ/см³ биотина, тогда как в предыдущем опыте инокулят был с одним только биотином.

Таблица 4

Добавление в синтетическую среду + 0,01 γ/см³ биотина	Число бактерий в миллионах на 1 см³, часы				Во сколько раз возросло число бактерий от 28 до 51 часа
	28	42	51	71	
0,01 γ/см³ тиамина	33	295	519	380	15,7
0,0068 γ/см³ пиримидина . . .	32	246	584	443	18,2
0,0048 γ/см³ тиазола	30	98	176	156	5,9

Изменение способа посева сказалось, во-первых, на числе клеток на 28-м часу, которое везде было приблизительно одинаковым; во-вторых, темп размножения бактерий значительно усилился. Количество внесенного с инокулятом тиамина ($\frac{0{,}001}{1200} = 0{,}0000008$ γ/см³) слишком ничтожно, чтобы вызвать такое усиление. Скорее это говорит о большей активности бактерий, выращенных на лучшей среде — с готовым тиамином.

Несмотря на эти отличия, подтвердилась активность пиримидина, не уступающая, если не превосходящая, активность тиамина. Напротив, тиазол ни в коей мере не способен заменить целую молекулу тиамина.

3. Влияние биотина на размножение культуры

Следующая задача состояла в уточнении вопроса о влиянии дозировок биотина на темп размножения и окончательный «урожай» бактерий.

Результаты одного из опытов, проведенных по указанной выше схеме, даны в табл. 5 (посев пипеткой).

Таблица 5

Добавление биотина в синтетическую среду с 1 γ/см³ тиамина	Число бактерий в миллионах на 1 см³, часы					Примечание
	24	28	42*	51	71	
0,00001 γ/см³ . .	5,5	31	**82**	78	9	
0,0001 γ/см³ . .	6,5	37	111	139	**185**	На следующий день наблюдается энергичный автолиз
0,001 γ/см³ . .	7,4	39	142	289	**447**	
0,01 γ/см³ . .	6,7	35	285	**703**	468	

Таблица 5 показывает, что в первые 28 часов скорость размножения бактерий не зависит от концентрации биотина. Разница начинает наблюдаться со вторых суток. Увеличение концентрации биотина в 10 раз повышает скорость размножения в 1,5—2 раза. Такая же закономерность наблюдается и в отношении максимального «урожая» (численности) бактерий, после которого автолиз берет перевес и число клеток уменьшается. Этот максимум при разных концентрациях биотина достигается в разное время (жирные цифры в табл. 5). Нижеследующие цифры показывают зависимость между дозировкой биотина и соотношением «урожая» бактерий.

Соотношение дозировок биотина	Соотношение «урожая» бактерий
0,01 : 0,001 = 10	703 : 447 = 1,6
0,001 : 0,0001 = 10	447 : 185 = 2,4
0,0001 : 0,00001 = 10	185 : 82 = 2,3

Примечательно, что разница в скорости размножения наступает лишь с того момента, когда интенсивность размножения начинает ослабевать, появляются клостридии и часть бактерий начинает отмирать. Таким образом, между содержанием в среде биотина, с одной стороны, и темпом размножения и общей численностью бактерий, с другой стороны, существует зависимость, более сложная, чем простая пропорциональность.

В других опытах учет развития бактерий был произведен методом, описанным в первом сообщении [3], а именно — по скорости газовыделения в особых аппаратах. Газовыделение стоит в прямой и простой связи с распадом сахара в процессе брожения. Но какова связь между сбраживанием сахара и ростом клеток?

Можно считать установленным, что между интенсивностью совершаемого клеткой энергетического процесса и темпом ее роста и размножения существует самое тесное и прямое соотношение. Все факторы (как накопление продуктов обмена, истощение субстрата, pH среды и пр.), замедляющие рост, одновременно ослабляют также и энергетические процессы. Сошлемся для примера на наши данные по влиянию среды на темп размножения и биохимическую деятельность уксуснокислых [1] и ацетоно-бутиловых бактерий [2]. Прекратившая размножение культура производит только очень слабую, постепенно затухающую биохимическую работу.

Из сказанного следует, что в молодой энергично размножающейся культуре ацетоно-этиловых бактерий скорость сбраживания сахара, а следовательно, скорость газовыделения, будет служить показателем

* Начиная с этой пробы появляются клостридии, и клетки начинают бледнее краситься.

темпа размножения клеток. Напротив, в старой, прекратившей рост культуре работа каждой клетки выражается незначительной, но постоянной величиной. В этом случае скорость газовыделения будет определяться численностью клеток и может служить критерием для суждения о количестве клеток в культуре. А поэтому, если судить по данным табл. 5, в первые сутки можно ожидать энергичного и независящего от количества биотина газовыделения. К началу же третьих суток, когда культура приближается к максимальной численности и кончает размножаться, скорость газовыделения должна бы упасть и вместе с тем стать различной в средах с разными дозировками биотина.

Таблица 6

Добавление биотина в синтетич. среду с 0,1 γ/см³ тиамина и 0,001 γ/см³ *p*-аминобенз. к-ты	Средняя скорость газовыделения см³/час, часы						
	9—24	24—33	33—47	47—56	56—72	72—81	81—144
0,00001 γ/см³	0,41	0,21	0,10	0,13	0,064	0,022	0,014
0,0001 γ/см³	0,39	0,29	0,18	0,15	0,104	0,046	0,022
0,001 γ/см³	0,39	0,27	0,22	0,25	0,206	0,126	0,056
0,01 γ/см³	0,45	0,29	0,19	0,21	0,226	0,200	0,124

Таблица 6 показывает, что высказанные соображения полностью подтверждаются опытными данными.

Ниже (табл. 7) даются выборочные данные, основанные на цифровом материале, приведенном в табл. 6, иллюстрирующие зависимость между содержанием биотина и скоростью газовыделения в конце брожения. Можно видеть, что при увеличении количества биотина в 10 раз газовыделение усиливается в 1,5—2,5 раза. Это соотношение полностью совпадает с тем, которое было найдено в предыдущем опыте по данным прямого подсчета числа бактерий. Таким образом, скорость газовыделения при правильной трактовке является верным отражением и темпа размножения, и максимального «урожая» бактерий.

Таблица 7

Соотношение дозировок биотина	Соотношение скоростей газовыделения		
	56—72 часа	72—81 час	81—144 часа
$\frac{0,01}{0,001}=10$	$\frac{0,226}{0,206}=1,1$	$\frac{0,200}{0,126}=1,6$	$\frac{0,124}{0,056}=2,2$
$\frac{0,001}{0,0001}=10$	$\frac{0,206}{0,104}=2,0$	$\frac{0,126}{0,046}=2,7$	$\frac{0,056}{0,022}=2,5$
$\frac{0,0001}{0,00001}=10$	$\frac{0,104}{0,064}=1,6$	$\frac{0,046}{0,022}=2,1$	$\frac{0,022}{0,014}=1,6$

4. Стимулирующее действие тиамина и парааминобензойной кислоты

Пользуясь методом измерения газовыделения, мы уточнили стимулирующее действие тиамина и *p*-аминобензойной кислоты в строго синтетических средах.

Один из опытов распадался на 2 серии — с 0,0001 γ/см³ и с 0,01 γ/см³ биотина. В каждой серии тиамин был дан в разных дозировках. Как показывает табл. 8 и рис. 1, газовыделение в первые сутки в сильной степени зависело от содержания тиамина, что говорит об его стимулирующем воздействии на темп размножения бактерий. Концентрация тиамина

0,1 γ/см³ оказалась оптимальной. Увеличение его дозировки до 1 и 10 γ/см³, т. е. в 10 и 100 раз, заметного ускорения уже не дает.

Что касается биотина, то его дозировка влияла на темп размножения культуры лишь при недостатке тиамина (рис. 1, 2*А* и 2*Б*). При избытке же тиамина (0,1 γ/см³) скорость газовыделения в первые сутки, иными словами, темп размножения бактерий не зависел от содержания биотина (рис. 1, 1*А* и 1*Б*). Это же явление было отмечено и раньше (см. табл. 6).

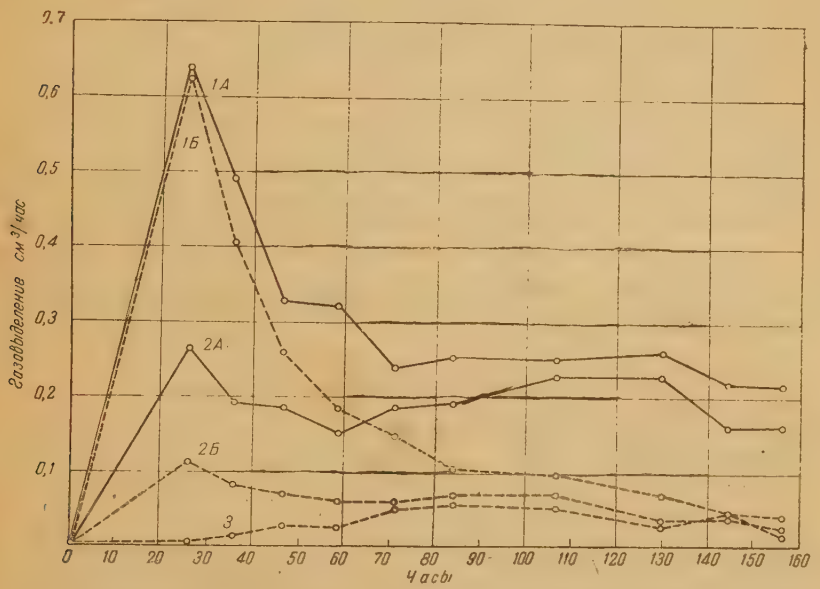

Рис. 1. Влияние дозировок биотина и тиамина на скорость газовыделения. Обозначения: *1А* — биотин 0,01 γ/см³, тиамин — 0,1 γ/см³; *1Б* — биотин 0,0001 γ/см³, тиамин 0,1 γ/см³; *2А* — биотин 0,01 γ/см³, тиамин 0,001 γ/см³; *2Б* — биотин 0,0001 γ/см³, тиамин 0,001 γсм³, *3* — биотин 0,0001 γ/см³, тиамин 0,00001 γ/см³

Совсем иная картина наблюдается в конце брожения, после 52 часов. К этому времени размножение бактерий приостанавливается и скорость газовыделения теперь служит показателем не темпа роста, а их общей численности («урожая»). А «урожай» бактерий очень мало зависит от содержания тиамина, который является лишь стимулятором, ускорителем размножения и, наоборот, «урожай» теснейшим образом связан с дозировкой биотина — обязательного «фактора роста» ацетоно-этиловых бактерий. Естественно ожидать, что в этот период скорость газовыделения будет определяться не тиамином, а биотином. И действительно, можно видеть, что газовыделение в пределах каждой серии, содержащей равные дозы биотина, становится почти одинаковым при всех дозировках тиамина. Особенно наглядно это видно на рис. 1. Средняя скорость газовыделения за этот период в серии с 0,01 γ/см³ биотина равна 0,250 см³/час и в серии с 0,0001 γ/см³ биотина — 0,066 см³/час. Соотношение скоростей $\frac{0{,}250}{0{,}066} = 3{,}8$ соответствует установленному в предыдущем разделе, где увеличение дозировки биотина в 10 раз увеличивало «урожай» бактерий (табл. 5) и скорость газовыделения (табл. 7) в 1,5—2,5 раза, а увеличение дозировки биотина в 100 раз увеличивало их в 3—5 раз.

Было также исследовано стимулирующее действие *р*-аминобензойной кислоты по тому же методу. В среде, в которой концентрация биотина и тиамина ниже оптимальной, *р*-аминобензойная кислота даже в небольшой дозировке усиливает газовыделение в $1^1/_2$ раза (табл. 9).

Таблица 8

Серия	Добавление в синтетическую среду γ/см³		Средняя скорость газовыделения см³/час, часы		
	биотин	тиамин	0—20	20—52	52—117
Первая	0,0001	0,00002	0,01	0 032	0,046
	0,0001	0 0001	0,05	0,040	0,054
	0,0001	0,001	0,10	0,066	0,060
	0,0001	0,01	0,33	0,138	0,072
	0,0001	0,1	0,48	0,194	0,094
Вторая	0,01	0,001	0,22	0,168	0,220
	0,01	0,01	0,40	0,150	0,210
	0,01	0,1	0,54	0,304	0,256
	0,01	1	0,48	0,190	0,262
	0,01	10	0,50	0,379	0,300

Таблица 9

Добавление в синтетическую среду γ/см³	Средняя скорость газовыделения см³/час, часы					
	0—6	6—20	20—27	27—90	90—117	117—140
Биотин 0,0001						
Тиамин 0,01	0,37	0,31	0,19	0,10	0,056	0,037
То же + *p*-аминобензойная к-та 0,001	0,60	0,41	0,25	0,15	0,108	0,056

Но в тех случаях, когда два других витамина присутствуют в оптимальных количествах, *p*-аминобензойная кислота проявляет значительно меньший ускоряющий эффект и притом только начиная со вторых суток (табл. 10). Оптимальная концентрация ее равна 0,001 γ/см³, дальнейшее увеличение не усиливает развития.

Таблица 10

Добавление *p*-аминобенз. к-ты в синтетич. среду с 0,001 γ/см³ биотина и 0,1 γ/см³ тиамина	Среднее газовыделение см³/час, часы		
	0—24	24—33	33—81
0	0,40	0,18	0,172
0,00001 γ/см³	0,41	0,19	0,176
0,0001 γ/см³	0,43	0,23	0,180
0,001 γ/см³	0,39	0,27	0,204
0,01 γ/см³	0,41	0,24	0,190
0,1 γ/см³	0,42	0,26	0,200

Выводы

1. Из трех ростовых веществ биотин является обязательным «фактором роста» для ацетоно-этиловых бактерий, — без него бактерии не могут развиваться. Тиамин (витамин B_1) и *p*-аминобензойная кислота ускоряют размножение, но в их отсутствие ацетоно-этиловые бактерии способны неограниченно долгое время развиваться без признаков вырождения.

2. Пиримидиновая часть тиамина влияет на рост бактерий в синтетической среде не слабее, чем целая молекула тиамина. Тиазольная часть никакого ростового эффекта не проявляет.

3. При избытке тиамина и меняющихся дозировках биотина (от 0,00001 до 0,01 γ/см³) размножение бактерий в первые сутки происходит с оди-

наковой скоростью. С конца вторых суток, когда начинается образование клостридий и темп размножения понижается, проявляется влияние дозировок биотина на рост бактерий. Именно, при увеличении дозировки в 10 раз скорость размножения возрастает в 1,5—2,5 раза. Зависимость между дозировками биотина и окончательным «урожаем» (максимальным числом) бактерий подчиняется тому же количественному выражению.

4. В противоположность биотину, содержание тиамина чрезвычайно сильно влияет на скорость развития в первые сутки, но почти не отзывается на окончательном «урожае» культуры. Оптимальная дозировка тиамина — 0,1 γ/см³. При 1 и 10 γ/см³ развитие больше не ускоряется.

5. Пара-аминобензойная кислота при недостатке биотина и тиамина сильно ускоряет развитие, при избытке первых двух веществ действие ее незначительно.

6. Сопоставление газовыделения и размножения бактерий показывает, что в первые сутки, в период энергичного размножения, скорость газовыделения является показателем темпа роста. В культуре старше двух суток, прекращающей размножение, скорость газовыделения служит показателем численности бактерий.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР

Получено 14.XI. 1944

ЛИТЕРАТУРА

1. Иерусалимский Н. Д. Связь между кислотообразованием и развитием уксуснокислых бактерий. Микробиология, т. VIII, стр. 160, 1939.
2. Иерусалимский Н. Д. Исследования по физиологии обмена веществ Cl. acetobutylicum. II. Влияние pH среды на развитие и жизнедеятельность бактерий. Микробиология, т. XI, стр. 244, 1942.
3. Иерусалимский Н. Д. и Булаткин А. Д. Влияние ростовых веществ на ацетоно-этиловые бактерии. I. Потребность бактерий в различных витаминоподобных веществах. Микробиология, т. XIV, вып. 6, стр. 107, 1945.
4. Королев С. А. Новый метод непосредственного счета клеток под микроскопом при общем плане микробиологического учета. Бюлл. № 77, Труды Вологодского молоч. хим. ин-та.
5. Eakin R. E., Snell E. E. and Williams R. J. A constituent of raw egg white capable of inactivating biotin in vitro. J. Biol. Chem., **136**, p. 801, 1940.
6. Kögl F. und Tönnis B. Über das Bios-Problem. Darstellung von crystallisierten Biotin aus Eigelb. Z. phys. Chem., 242, 43, 1936.
7. Pennington D., Snell E. and Eakin R. Crystalline avidin. J. Amer. Chem. Soc., 64, 469, 1942.

INFLUENCE OF GROWTH SUBSTANCES UPON ACETONE-ETHYLIC BACTERIA. II. RESPONSE OF THE BACTERIA TO BIOTIN, THIAMINE AND P-AMINOBENZOIC ACID

By *N. D. Jerusalimsky*

Summary

1. Of the three growth substances of acetone-ethylic bacteria biotin is the indispensable «factor of growth» in the absence of which these bacteria are not able to grow. Thiamine (vitamin B_1) and *p*-aminobenzoic acid accelerate growth of these bacteria. However acetone-ethylic bacteria are capable of multiplying during an unlimited period without showing any trace of degeneration in their absence.

2. The influence of the pyrimidine part of thiamine upon the growth of bacteria in a synthetic medium is not less them that of the entire thiamine molecule.

3. When thiamine is present in an excessive amount and biotin dosage is varying from 0.00001 to 0.01 γ/cc. the growth of bacteria during the first

day proceeds at an equal rate. From the end of the second day onwards, when the clostridia are beginning to form and the multiplication rate decreases, the influence of biotin dosage upon the growth rate of bacteria comes to light. The growth rate is increased 1.5—2.5 fold by a 10-fold rise in the dosage of biotin. Dependence between the biotin dosage and the final «yield» (the highest number) of bacteria is governed by the same quantitative relations.

4. In distinction to biotin the thiamine content shows a strong influence on the growth rate during the first day, but shows almost no influence upon the final «yield» of the culture. The optimal dosage of thiamine is equal to 0.1 γ/cc. The growth rate is not increased when the thiamine dosage is raised to 1 and 10 γ/cc.

5. *p*-aminobenzoic acid strongly increases the growth rate when there is a deficit of thiamine and biotin, in the presence of an excess of these two substances the influence of *p*-aminobenzoic acid is but slight.

6. Comparison of the rate of gas pruduction to that of the growth of bacteria shows that during the first day i. e. the period of intense growth, the rate of the gas production may serve as an index of the growth rate. In the culture more than two days old, in which the growth is beginning to stop, the rate of gas production serves as an index of the numbers of bacteria.

Institute of Microbiology of
the Academy of Sciences of the USSR
Moscow

СИМБИОЗ МОЛОЧНОКИСЛЫХ СТРЕПТОКОККОВ С ПОДВИЖНЫМИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИМИ БАКТЕРИЯМИ

М. Р. Гибшман

Известные по литературным данным симбиозы молочнокислых стрептококков с другими видами бактерий представляют собой, в основном, сочетание стрептококков с дрожжами и молочнокислыми палочками (кефир, кубанская простокваша, норвежское тягучее молоко и др.).

В 1932 г. проф. С. А. Королевым [3] был изучен (при участии Гибшман, Мироновой и Саввичевой) и описан неизвестный ранее симбиоз молочнокислых стрептококков с подвижными «овальными» диплококками. Диплококки не относились к группе молочнокислых бактерий, были ацидофильны и на поверхности подкисленного бульона образовывали пленку. Поверхность молока, сквашенного симбиотической культурой, всегда имела оранжево-желтый цвет. Этот тесный симбиоз был обнаружен Королевым в тягучей культуре молочнокислого стрептококка, выделенного Рудометкиной из новосибирской сметаны (в 1926 г.). Более широкое распространение в природе подобных симбиозов осталось невыясненным.

Дальнейшие исследования Рудометкиной [5] и Богданова [1] показали, что этот симбиоз способен пептонизировать молоко при длительном стоянии при 30° (40 дней). Богданов подтвердил, что эта смесь культур не случайна и представляет собой тесный симбиоз, так как вымирание чистой культуры молочнокислого стрептококка происходит несравненно быстрее, чем в симбиозе с подвижной культурой. Выяснение вопроса о нахождении подвижных бактерий (описанных Королевым) в других симбиозах и изучение их свойств и явилось задачей настоящей работы. В данной работе мы имели симбиоз, который в течение 11 лет не утратил своей активности, и 4 производственные культуры молочнокислых стрептококков с Ленинградского маргаринового завода, которые при сквашивании молока давали на его поверхности сгустки, оранжево-желтый пигмент и при исследовании оказались симбиозами молочнокислых стрептококков с подвижными бактериями. Мы предположили, что подвижные бактерии можно обнаружить и в других симбиозах, например, таких стойких и сложных, как кефирные грибки.

В связи с этим было исследовано 24 образца кефирных грибков, полученных из различных мест. Во всех образцах были найдены подвижные бактерии, подобные выделенным из сибирского симбиоза.

Выделение производилось следующим образом: кефирные грибки помещались в мясопептонный бульон при 30°. В бульоне мы всегда обнаруживали большое количество подвижных бактерий. Подвижные бактерии не обнаруживались при помещении кефирных грибков в молоко или сыворотку. Но они были найдены в молоке и сыворотке при «заболевании» грибков, которое внешне выражалось в ослизнении последних (происходило под влиянием плохого качества молока, редких промывок, внезапного повышения температуры культивирования и т. д.).

В 1932/34 г. была проведена большая работа под руководством А. Ф. Войткевича [2] по изучению микрофлоры кефирных грибков. В составе микрофлоры грибков Старыгиной и Халдиной [7] были обнаружены «пептонизирующие» бактерии. Предполагаем, что часть этих «пептонизирующих» бактерий были близкими к подвижным бактериям, найденным нами.

Таким образом, в нашем распоряжении имелись подвижные бактерии (которые в дальнейшем будем условно именовать «подвижными протеолитическими», так как они способны вызывать протеолиз молока), выделенные из пяти симбиотических культур с молочнокислыми стрептококками и 24 образцов кефирных грибков. Все подвижные бактерии давали желтый пигмент на поверхности сгустка молока при совместном культивировании их с молочнокислыми бактериями.

Для краткости приводим данные для шести протеолитических культур, которые являются достаточно характерными для выделенных нами

представителей. Три из них, выделенные из симбиозов с молочнокислыми стрептококками, обозначим №№ 1, 2 и 3 и три культуры, выделенные из кефирных грибков, №№ 4, 5 и 6.

Молочнокислые стрептококки, выделенные из симбиозов с протеолитическими бактериями №№ 1, 2 и 3, обозначим римскими цифрами I, II и III и выделенные из кефирных грибков №№ IV, V и VI.

Основные свойства щелочеобразующих бактерий

1. Морфологические и культуральные признаки

В молоке и мясопептонном бульоне протеолитические бактерии имеют овальную или чуть более вытянутую форму. Размер клеток в возрасте 24 часов в молоке 0,4—0,5 μ × 0,7—0,8 μ, в мясопептонном бульоне 0,6 μ × 0,8 μ, реже 1,2 μ; на мясопептонном агаре клетки были вытянуты 0,6—0,8 μ × 1,0—1,2 μ, и одна культура, выделенная из больного кефирного грибка, имела на агаре клетки размером 0,7—0,8 μ × 1,2—1,6 μ до 2,4 μ.

На агаре все культуры давали совсем небольшое количество инволюционных нитевидных клеток, более длинных в штаммах, выделенных из кефирных грибков (от 6—10 μ до 20 μ) (табл. 1).

Протеолитические бактерии из симбиозов со стрептококками №№ 1, 2 и 3 имели вид диплококков, овальной формы, с более мелкими клетками. Смешанная культура в молоке типичных молочнокислых стрептококков с протеолитическими бактериями на фиксированном препарате могла произвести впечатление монокультуры, в то время как протеолитические бактерии, выделенные из кефирных грибков, чаще имели несколько более удлиненную форму.

Все протеолитические бактерии — грамотрицательные, подвижные перетрихи[1]. Клетки, снабженные жгутиками, соединяются в подвижные цепочки.

На мясопептонном агаре культуры образуют плоские, прозрачные, ясно очерченные, маслянистые, блестящие гомогенные колонии с амебовидными выростами, иногда более круглые. Размер колоний 1,3—1,7 мм до 2,0 мм. При старении колонии становятся желтоватыми (темнее в центре). На подкисленном агаре колонии вырастают более крупными (до 3,2 мм), также с амебовидными выростами, но более ясно пигментированными в желто-оранжевый цвет.

На мясопептонной желатине вырастают мелкие колонии, круглые или с нежной бахромкой по краю, размер 0,7—0,9 мм. (На сывороточном агаре размер колоний 0,7—1,0 мм и на сусловом — до 2,2 мм). При посеве штрихами на косом мясопептонном агаре культуры по посеву также образуют амебовидные, перистые выросты. При наличии конденсационной воды в этой пробирке, на поверхности воды вырастает пленка, поднимающаяся вверх по стеклу и ползущая вверх по агару до $^1/_4$ его поверхности (через 6—10 дней).

При посеве в конденсационную воду на дне пробирки, подвижные протеолитические бактерии дают сплошной ползущий рост, поднимающийся до $^1/_4$ поверхности косого агара, а также по краям агара до самого верха, в виде отдельных колоний. На мясопептонном агаре (из мяса, но не экстракта) через 7—10 дней протеолитические бактерии образуют по всей поверхности агара беловатый опалесцирующий налет, коричневатый в проходящем свете, причем вокруг колоний остается прозрачная зона. Налет является результатом не роста культуры, а, повидимому,

[1] Окраска жгутиков производилась в 24-часовых культурах щелочеобразующих бактерий с агара по методу Conn и Wolfe [8]; весь процесс окраски занимал 30—40 мин., и четкость изображения была весьма ясной.

Таблица 1

Основные свойства подвижных протеолитических бактерий

	Размер клеток в микронах			Рост на МПБ	Отношение к лакмусу	Колонии на МПА	Рост на косом МПА в конд. воде	Разжижение желатины	Подвижность	Окраска по Граму	Образование H_2S на мясе	Превращение нитратов в нитриты	Образование индола
	Молоко	МПБ	МПА										
№ 1	0,4 × 0,7	0,6 × 0,8	0,6 × 0,8—1,0	Нежная пленка и муть	Не измен.	Амебовидные	Ползуч. 1/4 аг.	Нет	Подвиж. перетр.	Отрицат.	0	+	Нет
№ 2	0,5 × 0,8	0,6 × 0,8 — 1,0	0,6 × 0,8—1,0		Не измен.		То же	»	То же	»	+	+	»
№ 3	0,4 × 0,7	0,6 × 0,8	0,6 × 0,8—1,0	То же	Слаб. посинение	Амебовидные	» »	»	» »	»	0	+	»
№ 4	0,5 × 0,8	0,6 × 0,8 — 1,0	0,6 × 0,9—1,2	Тяжелая пленка и муть	Посинение	Амебовидные	» »	»	» »	»	+	0	»
№ 5	0,5 × 0,8	0,6 × 0,8 — 1,2	0,6 × 0,8 — 1,2	То же	Посинение	Амебовидные	» »	»	» »	»	Следы	+	»
№ 6	0,4 × 0,7	0,6 × 0,8 — 1,0	0,6 × 0,7 × × 0,8 — 1,2	» »	Посинение	Амебовидные	» »	»	» »	»	+	+	»

пигментации поверхности агара или воздействия культуры на пептон и изменения реакции среды. При посеве в желатину уколом культуры дают гвоздевидный рост (со шляпкой). Желатину не разжижают.

Развиваясь в жидкой среде (мясопептонный бульон, сыворотка и т. д.), всегда образуют на поверхности пленку, более нежную у культур, выделенных из симбиозов со стрептококками, и более тяжелую, падающую на дно у культур, выделенных из кефирных грибков. Растут на картофеле, давая желто-серый ограниченный налет. На среде Эндо дают суховатый рост, образуя вначале белые колонии, которые через 24—30 часов краснеют, приобретают металлический блеск и вызывают покраснение среды.

В колбах пленка поднимается высоко вверх по стенкам. Протеолитические бактерии обладают более ясно выраженными аэробными свойствами по сравнению с молочнокислыми стрептококками. В симбиозе с молочнокислыми бактериями дают на поверхности сгустки молока — оранжево-желтый пигмент.

2. Биохимические свойства подвижных протеолитических бактерий

Протеолитические бактерии способны давать сероводород при посеве на стерильное говяжье мясо, но не в мясопептонном бульоне. Одни из них образуют сероводород активно, например, №№ 2, 4 и 6, другие — едва заметно или не образуют его. Протеолитические бактерии (кроме одной культуры) способны были превращать нитраты в нитриты. Не образуют индола. Все протеолитические бактерии не дают кислоты в молоке, а, наоборот — подщелачивают его в различной степени. №№ 1, 2 и 3 подщелачивают молоко на 6—7°Т, а №№ 4, 5 и 6 на 18—20°Т (через 30 дней при 30°). Лакмусовое молоко культуры №№ 1 и 2 не изменяют, № 3 вызывает слабое посинение и №№ 4, 5 и 6 — более сильное (см. табл. 1). Все культуры подщелачивают также мясопептонный бульон. Но, с другой стороны, несмотря на щелочеобразующую способность, культуры являются явными ацидофилами. Все протеолитические бактерии хорошо развиваются и образуют пленку через 24 часа в мясопептонном бульоне с глюкозой при pH среды от 3,6 до 8,0, а одна культура развивалась даже при pH = 3,1 (№ 4). Через 10 дней было отмечено развитие всех культур при pH = 9,0, в то время как обычные молочнокислые стрептококки и выделенные из симбиозов развивались только при pH от 4,5 до 8,0—8,5. Эти ацидофильные свойства протеолитических бактерий и дали нам метод быстрого разделения симбиозов.

При посеве симбиозов на любую твердую среду (мясопептонный агар, томатный и т. д.) с обычным pH = 6,8—7,0 почти всегда вырастают колонии из смешанных культур, что является большим затруднением при разделении этих тесных симбиозов. При посеве же любого симбиоза на твердые среды с pH = 3,6, 4,2 (к расплавленной твердой среде с обычным pH перед посевом добавляется 0,3—0,5 см³ 10% стерильной молочной кислоты) всегда вырастают только чистые культуры протеолитических бактерий, так как молочнокислые стрептококки при этой реакции среды не развиваются. Выделение следует производить через 48—72 часа после посева (выделенные культуры были проведены пять раз через чашки с подкисленным агаром). Протеолитические бактерии обладают протеолитической активностью, выраженной в различной степени в молоке с мелом. Культуры, слабо подщелачивающие молоко (понижающие кислотность на 6—7°Т), в молоке с мелом в большинстве случаев не вызывали заметного растворения белков и имели протеолитическую активность 14,0—16,0, лишь в одном случае 40,0 (по Вильштеттеру через 15 дней при 30°). Культуры, подщелачивающие обычное молоко сильнее (на 18—20°Т), в молоке с мелом вызывали заметное растворение белков.

Молоко становилось прозрачным, желто-коричневым, и протеолитическая активность культур колебалась в пределах от 30,0 до 40,0.

В данной работе мы не выясняли вопроса, какой характер имело это растворение белков и какую роль играл мел в повышении протеолиза белков в молоке, зараженном протеолитическими бактериями. Молочнокислые стрептококки, бывшие в симбиозе с подвижными бактериями, имели протеолитическую активность в пределах от 2,0 до 10,0.

При соединении протеолитических бактерий с молочнокислыми стрептококками протеолитическая активность смешанных культур повышалась. Культура № 3 в симбиозе со стрептококками имела протеолитическую активность 46,0, а в чистом виде — 14,0, культура № 1 — 20,0, а в чистом виде — 16,0.

Довольно характерной особенностью протеолитических бактерий было отношение их к углеводам (на среде Орла Иенсена[1] + 0,5% пептона + + 2% автолизата). Они сбраживали из углеводов только глюкозу (с различной активностью) и пентозы (арабинозу и ксилозу), обе или одну (кроме культуры № 3). Культуры не сбраживали лактозы, галактозы, сахарозы, мальтозы, декстрина, крахмала, маннита и глицерина. Эти углеводы не тормозили в большинстве случаев развития протеолитических бактерий и бульон с углеводами подщелачивался. Следует особо отметить, что все исследованные нами культуры протеолитических бактерий были неспособны развиваться в чистой синтетической среде Орла Иенсена или при добавлении к ней одних углеводов — глюкозы (даже через 10 дней), при отдельной стерилизации среды и сахара. Но сбраживание углеводов наблюдалось при совместной стерилизации глюкозы и среды. Повидимому, при этом образуются, как указывал Орла Иенсен, какие-то активаторы (метилглиоксаль). При добавлении к среде Орла Иенсена с глюкозой (при отдельной стерилизации) факторов роста в количестве 0,05—0,1% (спиртового экстракта печени или водного стерильного экстракта люцерны) и посева в нее протеолитических бактерий постоянно отмечалось активное сбраживание глюкозы.

Следовательно, хотя протеолитические бактерии способны образовывать желтый пигмент (типа флавина, как предполагает О. К. Палладина), но они так же, как молочнокислые бактерии, нуждаются в факторах роста. Комбинация протеолитических бактерий с молочнокислыми стрептококками развивалась в среде Орла Иенсена с глюкозой без добавления активаторов, и при отдельной стерилизации углеводов и среды.

Чистые культуры протеолитических бактерий никогда не образовывали ни летучих кислот, ни ацетил-метил-карбинола (ацетоина) ни в молоке, ни в бульоне с глюкозой. Они способны были развиваться при температурах от 8—10° до 40°, с оптимальной температурой в 30°. Могли развиваться в мясопептонном бульоне с поваренной солью, при концентрации последней не более 1—2%.

Таким образом, описанная группа подвижных протеолитических бактерий с указанными свойствами дает возможность отнести их к группе подвижных гнилостных бактерий, но являющихся одновременно ацидофилами.

Трудность точной диагностики выделенных протеолитических бактерий может быть объяснена тем, что длительное пребывание культур в симбиозе с молочнокислыми стрептококками (а в кефирных грибках еще с дрожжами и молочнокислыми палочками) наложило на них определенный отпечаток. Это затрудняет отнесение протеолитических бактерий к какой-либо из групп по существующим классификациям. Мы предполагали, что они близки к группе Proteus. Но весьма возможно, что мы встретились с новой, не известной ранее группой бактерий.

[1] Состав видоизмененной среды Орла Иенсена: KH_2PO_4 0,5%, $MgSO_4$ 0,1%, NaCl 0,1%, $FeCl_2$ 0,001%, $NaHPO_4$ 0,2%; следы хлористого и сернистого аммония pH = 6,8—7,0. Лимоннокислый аммоний заменен фосфорнокислым натром.

Основные свойства молочнокислых стрептококков, выделенных из симбиозов

Для выделения молочнокислых стрептококков были использованы различные темпы размножения в молоке стрептококков и протеолитических бактерий.

Так, через 8—12 часов в 1 см³ свернутого молока, зараженного симбиозом, при 30° содержится: молочнокислых стрептококков 2 миллиарда, щелочеобразующих бактерий 35 миллионов.

После свертывания молоко высевалось на мясопептонный агар (соответствующие разведения) и колонии выделялись сразу после их появления (выделенные таким образом стрептококки до начала исследования были пять раз проведены через чашки с агаром).

Изучение морфологических свойств молочнокислых стрептококков, выделенных из симбиозов с протеолитическими бактериями, а также из некоторых кефирных грибков, показало, что протеолитические бактерии могут быть в симбиозе с молочнокислыми стрептококками, имеющими колонии как типа S, так и колонии, напоминающие тип R молочнокислых палочек.

Из симбиотических культур были выделены молочнокислые стрептококки, которые оказались типичными R-формами, дающими крупные, плоские прозрачные локонообразные колонии и по микроскопическому препарату — длинные цепочки. Все же остальные культуры молочнокислых стрептококков, выделенные из других симбиозов, были S-формами с мелкими, гладкими, выпуклыми, круглыми, четко очерченными колониями и микроскопически — диплококками и короткими цепочками клеток.

Часто на 3—7-е сутки вокруг материнских колоний и на поверхности их образовывались выросты и валики дочерних колоний. Все молочнокислые стрептококки были грамположительными и по сбраживанию углеводов были близкими между собой. Культуры S-типа, а также дающие локонообразные колонии, сбраживали одни и те же углеводы — лактозу, глюкозу, мальтозу, декстрин и маннит и не сбраживали пентоз (кроме III), галактозы, сахарозы, крахмала и глицерина. Молочнокислые стрептококки не обладали протеолитической активностью, не образовывали летучих кислот (дестилляционные числа — 7,0—8,0 в литре дестиллята из молока и 5,0—6,0 из бульона), но продуцировали ацетоин + диацетил. Повидимому, длительное пребывание в симбиозе наложило на молочнокислые стрептококки определенный отпечаток, так как морфологически они хотя и значительно разнятся между собой, но биохимические свойства их почти одни и те же.

Совместное культивирование подвижных протеолитических бактерий с молочнокислыми

Как указывалось, протеолитические бактерии только при совместном культивировании с молочнокислыми стрептококками образовывали оранжевый пигмент на поверхности сгустка молока. Пигмент образовывался протеолитическими бактериями (независимо от источника их выделения) при совместном культивировании: во-первых, со стрептококками, выделенными из симбиозов с протеолитическими бактериями и из кефирных грибков, во-вторых, со всеми коллекционными штаммами Streptococcus lactis, Streptococcus cremoris и, в-третьих, с коллекционными штаммами молочнокислых палочек B. bulgaricus и B. casei, причем культуры протеолитических бактерий, выделенные из кефирных грибков, были более активными образователями пигмента.

Часто при первом пересеве в смешанных культурах образовывался слабый пигмент (через 24 часа), а при дальнейших пересевах пигмен-

тирование увеличивалось, повидимому, за счет постепенного «привыкания» культур друг к другу.

Энергия кислотообразования в смешанных культурах в одних случаях повышалась при первом пересеве, а при последующих понижалась, в других случаях — наоборот. Время свертывания во всех смешанных культурах ускорялось по сравнению с чистыми культурами молочнокислых стрептококков. При дальнейших пересевах наблюдается еще более быстрое свертывание молока.

Некоторое повышение кислотности молока и образование пигмента наблюдалось только при совместном культивировании протеолитических бактерий с группой энергичных кислотообразователей. При совместном же культивировании протеолитических бактерий с группой цитровирусов Streptococcus paracitrovorus не наблюдается ни повышения кислотности, ни образования пигмента. Особо отмечаем, что при соединении энергичных кислотообразователей или цитроворусов с протеолитическими бактериями смешанные культуры имеют через 24—48 часов очень неприятный запах, что, конечно, крайне нежелательно для закваски.

Особенностью смешанных культур протеолитических бактерий с молочнокислыми стрептококками (также коллекционными культурами) было образование ими довольно значительных количеств летучих кислот. Образовывалась главным образом уксусная кислота. Разгонки по Дюкло показали, что соотношение летучих кислот: уксусной и пропионовой равно 4 : 1.

Как указывалось выше, культуры в отдельности протеолитические и молочнокислые никогда не давали летучих кислот.

Культуры протеолитических бактерий, выделенные из кефирных грибков, были идентичными с культурами, выделенными из симбиозов с молочнокислыми стрептококками, но более активными почти во всех отношениях. При совместном культивировании их с молочнокислыми бактериями они дают ту же картину, как протеолитические бактерии, бывшие длительное время в симбиозе с молочнокислыми стрептококками. Поэтому считаем, что протеолитические бактерии являются не случайной микрофлорой кефирного грибка, а постоянной.

Предполагаю, что описанные нами симбиозы молочнокислых стрептококков с подвижными протеолитическими бактериями по всем своим свойствам подходят к «О» муковидным формам гомоферментативных стрептококков, описанных О. К. Палладиной [4], стр. 45 — сбраживание углеводов, стр. 73 — действие активаторов, стр. 153 — характеристика III биотипа, объединяющего все «О» мукоидные формы и т. д. Чистые же культуры щелочеобразующих бактерий представляют собой «стабилизированные» культуры этого же автора.

Мы пытались изменить свойства чистых культур подвижных протеолитических бактерий, воздействуя на них различными количествами фенола (0,25 и 0,5%), нагреванием при 50—70° в течение 5 и 15 мин., а также длительным выдерживанием культур при 37—40° (последнее на синтетической среде с лактозой и глюкозой), однако ни одним из этих способов не удалось вызвать изменения в свойствах указанных культур.

Работа проведена при участии научного сотрудника Л. А. Банниковой и ст. лаборанта Е. Н. Дерявиной.

Выводы

1. Подвижные протеолитические бактерии были выделены из пяти симбиотических культур с молочнокислыми стрептококками и из 24 образцов кефирных грибков. Протеолитические бактерии являются постоянной микрофлорой кефирных грибков.

2. Подвижные протеолитические бактерии не могут быть отнесены к группе молочнокислых бактерий и характеризуются следующими признаками: подвижные, укороченные палочки, перитрихи. Растут на различных питательных средах (МПА, желатина, сывороточный и сусловый агар, картофель, среда Эндо). Дают прозрачные гомогенные плоские маслянистые колонии с амебовидными выростами. При засеве в конденсационную воду слабо ползучий рост, на бульоне муть с образованием пленки. Развитие при температурах от 8° до 40° с оптимумом при 30°. Обладают явными ацидофильными свойствами и растут при pH от 3,6 до 8,0, хуже при 9,0, в то время как молочнокислые стрептококки развиваются при pH = 4,5—8,0—8,5. Дают сероводород на мясе и превращают нитраты в нитриты. Подщелачивают бульон и (сильнее) молоко. В молоке с мелом вызывают растворение белка. Не образуют летучих кислот и из углеводов сбраживают только глюкозу и пентозы (последние не все штаммы). На основании изложенного считаем возможным отнести протеолитические бактерии к группе гнилостных, подвижных бактерий, но обладающих ацидофильными свойствами. Для указанной группы бактерий нет места в существующих классификациях. Возможно, что это новая, неизвестная ранее группа, или это — бактерии, сильно изменившие свои свойства в результате длительного симбиоза с группой молочнокислых бактерий.

3. Молочнокислые стрептококки, выделенные из симбиоза с протеолитическими бактериями, относятся по морфологическим и культуральным признакам к S-формам, а также иногда дают локонообразные колонии, подобные R-колонии молочнокислых палочек.

Несмотря на значительную разницу в морфологических признаках эти культуры имели сходные биохимические свойства. Они не образуют летучих кислот, продуцируют ацетоин + диацетил и сбраживают одни и те же углеводы. Повидимому, длительное пребывание в симбиозе с протеолитическими бактериями наложило определенный отпечаток на их свойства.

4. При совместном культивировании в молоке протеолитических бактерий с молочнокислыми стрептококками и палочками образуется оранжевый пигмент на поверхности сгустка. Смешанные культуры этих микробов образуют повышенные количества летучих кислот. Кислотность у одних симбиотических культур при длительном культивировании понижается, у других повышается. Ускоряется время свертывания и усиливается протеолиз. Вкус смешанных культур в молоке неприятный, горький.

Всесоюзный научно-исследовательский институт молочной промышленности

Поступило 21.III. 1943

ЛИТЕРАТУРА

1. Богданов В. М. Явление тягучести в заквасках. Микробиология, т. VI, вып. 6, стр. 805, 1937.
2. Войткевич А. Ф. Курс микробиологии молока и молочных продуктов, Пищепромиздат, 1940.
3. Королев С. А. Основы технической микробиологии молочного дела. Сельхозгиз, стр. 200, 1932.
4. Палладина О. П. Биология возбудителей молочнокислого брожения. Пищепромиздат, 1941.
5. Рудометкина А. Н. Сибирские пептонизирующие молочнокислые расы типа Str. lactis. Молочная промышленность, вып. 6, стр. 27, 1936.
6. Самкевич С. А. Изучение пептонизирующих бактерий кефира. Микробиология, т. III, вып. 1, стр. 103, 1934.
7. Старыгина А. П. и Халдина М. Изучение микрофлоры кефира с целью приготовления его на чистых культурах. Микробиология, т. III, вып. 1, стр. 88—102, 1934.
8. Conn H. and Wolfe G. Flagella Staining as a Routine test for Bacteria. J. Bact., 36, 517, 1938.

SYMBIOSIS OF LACTIC-ACID STREPTOCOCCI WITH MOTILE PROTEOLYTIC BACTERIA

By *M. R. Gibshman*

Summary

1. Motile proteolytic bacteria were isolated from 5 symbiotic cultures containing lactic-acid streptococci and from 24 specimens of the kefir yeasts. The proteolytic bacteria form the constant microflora of the kefir yeasts.

2. The motile proteolytic bacteria can not be referred to the group of lactic-acid bacteria and are characterized by the following properties: they are motile, shortened rods, peritrichae. They grow on different nutritive media (meat peptone agar, gelatine, serum, and must agar, potatoes, Endo-medium). They produce transparent, homogeneous flattened oily colonies with amoeboid outgrowths. Being inoculated into condensation water they show a scanty creeping growth. Being inoculated into broth they produce turbidity and a film. Development temperatures range from 8° to 40°, the optimum lying at 30°. The bacteria are clearly acidophylous and grow at pH values varying from 3.6 to 8.0. Weaker growth is observed at pH = 9.0 while-lactic acid streptococci grow at pH = 4.5 — 8.0 — 8.5. They form hydrogen sulphide on meat and transform nitrates into nitrites. They make broth and (to a greater degree) milk alkaline. In milk with chalk they dissolve protein. They do not form volatile acids and of all carbo-hydrates ferment only glucose and pentoses (the latter are fermented by not all the strains).

On the ground of the data presented there is every reason to regard these proteolytic bacteria as putrefactive motile bacteria possessing acidophylous properties. There is no room in the existing systems of classification for the group of the bacteria in question. It is possible that the group of bacteria under consideration is a new one not known before, or they have greatly changed their characteristics due to a long symbiosis with lactic-acid bacteria.

3. Lactic-acid streptococci, isolated from a symbiosis containing the proteolytic bacteria on the ground of their morphological and cultural characteristics, must be referred to «S»-forms. Occasionally they form curly colonies, resembling the «R»-colonies of the lactic-acid rods.

In spite of their considerable morphological differences these strains have similar biochemical properties. They do not form volatile acids, they produce acetoin and diacetyl and ferment the same carbo-hydrates.

Apparently, their changed characteristics are due to the long side-by-side existence in symbiosis with the proteolytic bacteria.

When these proteolytie bacteria are cultivated together with lactic-acid streptococci and rods in milk an orange pigment is formed on the surface of the clot. Mixed cultures of these microbes lead to the formation of an increased amount of volatile acids. After prolonged cultivation the acidity of the symbiotic strains decreases, while that of others is increased.

О СОХРАНЕНИИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧЕРНОГО БАКТЕРИОЗА В СЕМЕНАХ ПШЕНИЦЫ

А. П. Клыков

Наличие Bact. translucens S. S. R. внутри зерновых злаков явление достаточно известное. Это одно из доказательств передачи инфекции через семена. Но отсюда вытекает другой вопрос — как долго возбудитель заболевания сохраняет в них свою жизнедеятельность. Срок оздоровления посевного материала имеет важное практическое значение.

Для разрешения этого вопроса мы взяли зараженные черным бактериозом семена десяти сортов пшеницы и периодически делали микробиологический анализ их с подсчетом количества бактерий [1]. Методика исследования была следующей.

Для освобождения от поверхностной инфекции семена промывались в текучей воде, дезинфицировались в течение 4 мин. сулемой (1 : 1 000) и снова промывались стерильной водой. Продезинфицированные зерновки, в количестве 1 г растирались в ступке с 10 см³ стерильной воды при постепенном подливании ее. Из полученной суспензии приготовлялись два разведения, кратные десяти. Все разведения в количестве 0,1 см³ высевались на агар в чашках Петри. Таким образом, на первую чашку высевалось 0,01 г, на вторую 0,001 г, на третью 0,0001 г зерна. Посеянная суспензия равномерно распределялась по агару шпателем Дригальского. По количеству выросших на агаре колоний делался подсчет бактерий на 1 г зерна.

Результаты периодических анализов сведены в таблице.

Почти во всех случаях вырастала чистая культура Bact. translucens. Всхожесть семян не терялась.

Сорт	Количество бактерий в тысячах на 1 г зерна			
	Начало	Через 6 мес.	Через 12 мес.	Через 3 года
Цезиум 0111	760	760	181	4.0
Мелянопус 069	1 120	120	36,2	1.0
Гордейформе 010	12 620	870	181	1,0
Гурон	1 030	224	6,0	0
Альбидум	690	81	24	0
Мильтурум 0321	3 240	380	125	0
Австралийская	1 020	760	58	0
Маркиз	3 890	45	0	0
Местная (Азово-Черном.)	2 100	720	499	0
Престон	760	522	78	0

[1] Первые анализы были проведены Н. Н. Поповой.

Из таблицы видно, что большинство сортов в течение трех лет полностью освобождается от инфекционного начала. Обращает на себя внимание сорт Цезиум 0111, который, по нашим наблюдениям, является постоянным носителем возбудителя черного бактериоза. В начале исследования количество бактерий у него было небольшое (по сравнению с другими сортами), но оздоровление шло очень медленно, и через три года в семенах этого сорта сохранилось наибольшее количество жизнеспособных бактерий.

Кинельская Госселекстанция
Куйбышевской области

Получено 13.IX. 1944

СОДЕРЖАНИЕ ТОМА XIV

ЗА 1945 г.

СОДЕРЖАНИЕ XIV ТОМА

Стр.

Белинькая Л. Н. см. Разумовская З. Г.

Белозерский А. Н. О химической природе волютина 29

Броцкая С. З. Термофильные протеолитические бактерии. I. Ослабление протеолитической активности 45

Булаткин А. Д. см. Иерусалимский Н. Д.

Буканова В. И. см. Мишустин Е. Н.

Васильева О. И. см. Мишустин Е. Н.

Ворошилова А. А. и Дианова Е. В. Среды улучшенного развития бактерий с полной и частичной заменой агар-агара 119

Гамова-Каюкова Н. И. Селекция уксуснокислых бактерий 338

Гибшман М. Р. Симбиоз молочнокислых стрептококков с подвижными протеолитическими бактериями 403

Гигаури Е. А. см. Рыжков В. Л.

Гурфейн Л. Н. О бактериях в Японском море. Суточные колебания количественного и качественного состава бактерий в воде бухты Золотой Рог (Владивосток). 277

Дианова Е. В. см. Ворошилова А. А.

Егорова А. А. и Ярмолюк Л. В. Опыт двадцатитрехлетнего поддержания свечения бактерий 265

Захаров И. П. и Назаренко Г. Ф. Применение продуктов автоклавного гидролиза белка для азотистого питания дрожжей и получения сивушного масла 113

Зябликова О. П. см. Разумовская З. Г.

Иерусалимский Н. Д. и Булаткин А. Д. Влияние ростовых веществ на ацетоно-этиловые бактерии. I. Потребность бактерий в различных витамино-подобных веществах 107

Иерусалимский Н. Д. Влияние ростовых веществ на ацетоно-этиловые бактерии. II. Отношение бактерий к биотину, тиамину и пара-амино-бензойной кислоте 393

Имшенецкий А. А. О ядерном аппарате бактерий . . . 65

Имшенецкий А. А. Нитрифицирующие бактерии и миксобактерии 177

Имшенецкий А. А. и Солнцева Л. И. Термофильные маслянокислые бактерии . . 324

Имшенецкий А. А. и Солнцева Л. И. О несовершенных формах миксобактерий . 220

Исаев Б. М. См. Крисс А. Е.

Исаченко Б. Л. 209

Исаченко Б. Л. Микробиология в Академии Наук СССР . 137

Калиненко В. О. Новая железобактерия реки Енисей. . . 292

Канунникова З. А. См. Штурм Л. Д.

Канунникова З. А. Зависимость биохимической активности молочнокислых бактерий (B. Delbrückii) от возраста культуры 330

Клейн Б. И. Понятие о виде в общей и медицинской микробиологии 35

Клыков А. П. О сохранении жизнеспособности возбудителя черного бактериоза в семенах пшеницы 413

Кондратьева Т. М. см. Мейсель М. Н.

Копп Ф. И. и Лимберг Е. Л. Микробиологические исследования озер Северного Казахстана. 281

Кореняко А. И. см. Красильников Н. А.

Корочкина О. И. Механизм окислительных процессов в денитрификации 57

Красильников Н. А. О классификации лучистых грибков Actinomycetales 164

Красильников Н. А. Прививка новых свойств вирулентности клубеньковым и некоторым неклубеньковым бактериям 230

Красильников Н. А. Стимуляция полового процесса у грибов продуктами жизнедеятельности бактерий . . . 377

Красильников Н. А. и Кореняко А. И. Мицетин и его бактерицидные свойства 80

Красильников Н. А. и Кореняко А. И. Антибактериальные свойства грибка Aspergillus niger 347
Крисс А. Е. Микроорганизмы восточной части Северного Ледовитого океана 268
Крисс А. Е., Рукина Е. А. и Исаев Б. М. Исследования строения актиномицетов с помощью электронного микроскопа 172
Кузнецов С. И. Биологический метод оценки богатства водоема биогенными элементами 248
Курсанов Л. И. Понятие о виде у низших растений . . . 210
Логинова Л. Г. Адаптация дрожжей. Кратковременное действие внешних факторов 310
Лимберг Е. Л. см. Коппф. И.
Лисовская Н. М. см. Мейсель М. Н.
Мейсель М. Н. и Кондратьева Т. М. Хондриосомный аппарат в клетках низших растительных организмов . . . 244
Мейсель М. Н., Трофимова Н. П. и Лисовская Н. П. Ростовые вещества и их влияние на строение и жизнедеятельность дрожжевых организмов 191
Мишустин Е. Н. Естественные варианты Bac. mycoides и их диагностика 367
Мишустин Е. Н. и Буканова В. И. Об ориентации бактериальных нитей в колонии Bac. mycoides. 86
Мишустин Е. Н. и Васильева О. И. Термофильные микроорганизмы почвы и причины, вызывающие их распространение 237
Назаренко Г. Ф. см. Захаров И. П.
«Пастер Луи» 297
Разумовская З. Г. и Белинькая Л. Н. Влияние этилового спирта на процесс окисления сорбита в сорбозу при синтезе аскорбиновой кислоты 50
Разумовская З. Г. и Зяблико ва О. П. Микробиологические наблюдения на пойменных озерах 287
Родина А. Г. Бактерии горячих источников Ходжа-Оби-Гарм 383
Рубенчик Л. И. К характеристике сульфатредуцирующих бактерий 357
Рукина Е. А. см. Крисс А. Е.
Рыжков В. Л. и Гигаури Е. А. Опыты по химиотерапии желтухи тутового шелкопряда 353
Саенко Н. Ф. Расообразование у дрожжей S. ellipsoideus и S. apiculatus в условиях симбиоза 299
Саенко Н. Ф. см. Фролов-Багреев А. М.
Селибер Г. Л. К вопросу об образовании углеводородов из жиров микроорганизмами . 254
Солнцева Л. И. см. Имшенецкий А. А.
Тарасевич Л. М. К морфологии полиэдров желтухи тутового шелкопряда 202
Таусон В. О. Энергетика процесса жирообразования . . . 3
Трофимова Н. П. см. Мейсель М. Н.
Федоров М. В. О химизме фиксации азота атмосферы азотобактером. Продуктивность азотфиксации на разных источниках углерода 94
Федоров М. В. Химизм фиксации азотоатмосферы азотобактером. Влияние на продуктивность азотфиксации поверхностно-активных веществ 146
Фролов-Багреев А. М. и Саенко Н. Ф. О дрожжах, выделенных из хересной пленки 320
Холодный Н. Г. О воздушном питании почвенных микроорганизмов 215
Шапошников В. Н. О «дыхании» молочнокислых бактерий 156
Штурм Л. Д. и Канунникова З. А. Распределение микроорганизмов в пресноводных иловых отложениях . . 260
Штуцер Ю. М. О симбиотических отношениях между целлюлозо-разлагающими бактериями и азотобактером . . 129
Ярмолюк Л. В. см. Егорова А. А.

CONTENTS OF VOL. XIV

Belinkaya L. N. See Razumovskaya N. G.

Belozersky A. N. On the chemical nature of volutin . . . 34

Brockaia S. Z. Thermophylic proteolytic bacteria. I. Inactivation of proteolytic activity 49

Bukanova V. I. See Mishustin E. N.

Bulatkin A. D. See Jerusalimsky N. D.

Cholodny N. G. On aerial nutrition of soil microorganisms . 219

Dianova E. V. See Voroshilova A. A.

Egorova A. A. and Yarmoliuk L. V. Preservation of the photogenic ability of a bacterium for 23 years under laboratory conditions 267

Fedorov M. V. On the chemical aspect of the fixation of atmospheric nitrogen by Azotobacter. The productivity of nitrogen fixation in the presence of various sources of carbon 105

Fedorov M. V. On the chemical aspect of the fixation of atmospheric nitrogen by Azotobacter. The influence of surface-active substances on the productivity of nitrogen fixation 154

Frolov-Bagreev A. M. and Saenko N. F. The yeast isolated from the sherry film . 323

Gamova-Kajukova N. I. Selection of the acetic-acid bacteria 346

Gibshman M. R. Symbiosis of lactic-acid streptococci with motile proteolytic bacteria . . 411

Gigauri E. A. See Rischkow V. L.

Gurfein L. N. On bacteria found in the Japanese Sea 280

Imšenecki A. A. On the nuclear apparatus of bacteria . . . 79

Imšenecki A. A. The nitrifying bacteria and myxobacteria . 190

Imšenecki A. A. and Solntzeva L. I. On the imperfect myxobacteria 229

Imšenecki A. A. and Solntzeva L. I. Thermophylic butyric-acid bacteria 329

Issaiev B. M. See Kriss A. E.

Issatchenko B. L. Microbiology in the Academy of Sciences of the USSR 137

Issatchenko B. L. 209

Jerusalimsky N. D. and Bulatkin A. D. The influence of the growth substances on acetone-ethylic bacteria. 1. The need of bacteria in various vitaminlike substances 112

Jerusalimsky N. D. Influence of growth substances upon acetone-ethylyc bacteria. II. Response of the bacteria to biotin, thiamine and *p*-aminobenzoic acid 401

Kalinenko V. O. A new ferrobacterium of Jenissei river . 292

Kanunnikova Z. A. Dependence of biochemical activity of the lactic-acid bacteria (B. Delbrückii) upon the age of culture 337

Kanunnikova Z. A. See Sturm L. D.

Klein B. I. The conception of species in general and medical microbiology 43

Klykov A. P. The preservation of the viability of the causative agent of bacteriosis in wheat seads 413

Kondratieva G. M. See Meissel M. N.

Kopp F. I. and Limberg E. L. Microbiological investigations of the lakes of Northern Kazakhstan 286

Koreniako A. I. See Krassilnikov N. A.

Korochkina O. I. The mechanism of oxidizing processes in denitrification 64

Krassilnikov N. A. The classification of ray-fungi Actinomycetales 171

Krassilnikov N. A. Engrafting of new virulence characters to nodule and some other bacteria 236

Krassilnikov N. A. Stimulation of the sex process in fungi by the products of bacterial metabolism 382

Krassilnikov N. A. and Koreniako A. I. Mycetin and its bacterial properties . . . 85

Krassilnikov N. A. and Koreniako A. I. Antibacterial pecularities of Aspergillus niger 352

Kriss A. E. The microorganisms of the eastern part of the arctic ocean 276

Kriss A. E., Rukina E. A. and Issaiev B. M. Electrone microscopic studies on the structure of Actinomycetes . 176

Kursanov L. I. The conception of species in its application to lower plants 210

Kusnetzow S. I. A biological method for the evaluation of a water-reservoirs, riches in biogenic elements 253

Loginova L. G. Adaptation in the yeast 319

Limberg E. L. See Kopp F. I.

Lissovskaia N. P. See Meissel M. N.

Meissel M. N. and Kondratieva T. M. The chondrio-

some apparatus in the cells of lower plant organism . . . 244
Meissel M. N., Trofimova N. P. and Lissovskaia N. P. The growth factors and their influence on the structure and life-activity of yeast organisms 201
Mishustin E. N. Natural variants of Bac. mycoides and their differentiation. 376
Mishustin E. N. and Bukanova V. I. On the orientation of bacterial filaments in Bac. mycoides colonies . . . 92
Mishustin E. N. and Vassilieva O. I. Thermophile microorganisms of soil and the causes of their spreading . . 243
Nazarenko G. Z. See Zakharov I. P.
«Pasteur Louis» 297
Razumovskaya Z. G. and Belinkaya L. N. Influence of ethyl alcohol on the oxidation of sorbite into sorbose in the synthesis of ascorbic acid 56
Razumovskaya Z. G. and Ziablikova O. P. Microbiological observations of flood-plain lakes 291
Rischkow V. L. and Gigauri E. A. The experiments on chemotherapy of jaundice in Bombyx mori 356
Rodina A. G. Bacteria of the Hodja-Obi-Garm hot springs 392
Rubentschik L. I. To the characteristics of sulphate reducing bacteria 366
Rukina E. A. See Kriss A. E.
Saenko N. F. Formation of the races in Saccharomyces ellipsoideus and Saccharomyces apiculatus 309
Saenko N. F. See Frolov-Bagreev A. M.
Schaposchnikov W. N. On the «respiration» of lactic acid bacteria 156
Seliber G. L. Concerning the production of hydrocarbons from fats by microorganisms . 259
Solntzeva L. I. See Imšenecki A. A.
Sturm L. D. and Kanunnikova Z. A. The distribution of microorganisms in fresh-water mud deposits 264
Stuzer J. M. On the symbiotic relations between cellulose decomposing bacteria and Azotobacter 136
Tarassevich L. M. On the morphology of the polyhedres of mulberry silk-worm Jaundice 207
Tausson W. O. Energetics of the process of fat formation. . . 3
Trofimova N. P. See Meissel M. N.
Vassilieva O. I. See Mishustin E. N.
Voroshilova A. A. and Dianova E. V. Media improving bacterial growth and totally or partly substituting agar 128
Yarmoliuk L. V. See Egorova A. A.
Zakharov I. P. and Nazarenko G. F. Utilization of the products of autoclave hydrolysis of protein for the nitrogen nutrition of yeasts and the production of fused oil 118
Ziablikova O. P. See Razumovskaia Z. G.

СОДЕРЖАНИЕ

Л. И. Рубенчик. К характеристике сульфатредуцирующих бактерий 357

Е. Н. Мишустин. Естественные варианты Bac. mycoides и их диагностика 367

Н. А. Красильников. Стимуляция полового процесса у грибов продуктами жизнедеятельности бактерий 377

А. Г. Родина. Бактерии горячих источников Ходжа-Оби-Гарм 383

Н. Д. Иерусалимский. Влияние ростовых веществ на ацетоно-этиловые бактерии. II. Отношение бактерий к биотину, тиамину и пара-амино-бензойной кислоте 393

М. Р. Гибшман. Симбиоз молочнокислых стрептококков с подвижными протеолитическими бактериями 403

А. П. Клыков. О сохранении жизнеспособности возбудителя черного бактериоза в семенах пшеницы 443

CONTENTS

L. I. Rubentschik. To the-characteristics of sulphate reducing bacteria 366

E. N. Mishustin. Natural variants of Bac. mycoides and their differentiation 376

N. A. Krassilnikov. Stimulation of the sex process in fungi by the products of bacterial metabolism 382

A. G. Rodina. Bacteria the Chodja-Obi-Garm hot springs. . 392

N. D. Jerusalimsky. Influence of growth substances upon acetone-ethylyc bacteria. II. Response of the bacteria to biotin, thyamin and *p*-aminobenzoic acid 401

M. R. Gibshman. Symbiosis of lactic-acid streptococci with motile proteolytic bacteria . . 411

A. P. Klykov. The preservation of the viability of the causative agent of bacteriosis in wheat sea's 413

Цена 8 руб.

ОТКРЫТА ПОДПИСКА НА ЖУРНАЛЫ АКАДЕМИИ НАУК СССР на 1946 г.

НАИМЕНОВАНИЕ ЖУРНАЛОВ	Количество номеров в год	Подписная цена в год
Вестник Академии Наук СССР	12	96
Доклады Академии Наук СССР (русское издание)	36	216
Доклады Академии Наук СССР (иностранное издание)	36	216
Известия Академии Наук СССР, серия математическая	6	54
Математический сборник	6	90
Прикладная математика и механика	6	63
Астрономический журнал	6	36
Известия Академии Наук СССР, серия физическая	6	72
Известия Академии Наук СССР, серия географическая и геофизическая	6	54
Журнал экспериментальной и теоретической физики	12	108
Journal of Physics	6	108
Журнал технической физики	12	144
Известия Академии Наук СССР, Отделение технических наук	12	180
Известия Академии Наук СССР, Отделение химических наук	6	63
Журнал общей химии	12	180
Успехи химии	6	48
Журнал физической химии	12	144
Acta Physicochimica	6	72
Журнал прикладной химии	12	126
Известия Академии Наук СССР, серия геологическая	6	90
Записки Всероссийского минералогического общества	4	30
Известия Всесоюзного географического общества	6	63
Почвоведение	12	72
Известия Академии Наук СССР, серия биологическая	6	72
Журнал общей биологии	6	45
Успехи современной биологии	6	60
Ботанический журнал	6	27
Советская ботаника	6	36
Зоологический журнал	6	54
Микробиология	6	54
Физиологический журнал СССР им. Сеченова	6	72
Биохимия	6	36
Известия Академии Наук СССР, серия истории и философии	6	54
Известия Академии Наук СССР, Отделение экономики и права	6	45
Советское государство и право	12	108
Известия Академии Наук СССР, Отделение литературы и языка	6	54
Наука и Жизнь	12	36
Природа	12	72

ПОДПИСКА ПРИНИМАЕТСЯ:

Конторой «АКАДЕМКНИГА», Москва, Волхонка, 14,
Книжным магазином «Академкниги», Москва, ул. Горького, 6;

Отделениями Конторы:

ЛЕНИНГРАД, Литейный, 53а; СВЕРДЛОВСК, ул. Малышева, 58;
ТАШКЕНТ, ул. К. Маркса, 29

и Отделениями «СОЮЗПЕЧАТИ»